

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

КАФЕДРА ЦИТОЛОГИИ И ГИСТОЛОГИИ

Каменицкий Илья Сергеевич

Выпускная квалификационная работа бакалавра

**Выявление факторов формирования фолликулов в яичниках
детей: киспептина, рецептора киспептина, ароматазы,
рецептора антимюллера гормона**

Научный руководитель:

Полякова В. О.

д. б. н., профессор

Фамилия И. О.

Санкт-Петербург

2017

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	2
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	4
1. 1. Яичник	4
1. 2. Факторы фолликулогенеза.....	20
1. 2. 1. Ароматаза	20
1. 2. 3. Лиганд–рецепторная система киспептина	29
2. 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.	34
2. 1. Материал.....	34
2. 2. Иммунофлуоресцентный анализ.....	35
2. 3. Морфометрия	36
2.4. Статистический анализ результатов исследования.....	37
3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	38
3. 1. Экспрессия киспептина, рецептора киспептина, рецептора антимюллерова гормона и ароматазы в яичниках детей.....	38
3. 2. Корреляции между экспрессией различных факторов фолликулогенеза в яичниках детей.	42
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	44
ВЫВОДЫ.....	46
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	47

ВВЕДЕНИЕ

Яичники – это парный орган, выполняющий две важные функции: репродуктивную, выражающуюся в формировании женских половых клеток, и эндокринную, реализующуюся в продукции половых гормонов. Это происходит благодаря протекающим в нем сопряжённым процессам овогенеза и фолликулогенеза. Сборка фолликулов в начале формирования яичников и последующее их развитие с переходом примордиальных фолликулов в последующие стадии являются критическими процессами в биологии яичников. Эти процессы непосредственно влияют на количество ооцитов, доступных для женщины на протяжении всей ее репродуктивной жизни. Когда пул примордиальных фолликулов истощается, происходит ряд физиологических изменений, известных как менопауза. Неподходящая координация этих процессов способствует патологиям яичников, таким как преждевременное угасание функции яичников и бесплодие. Выявление и оценка степени экспрессии, а также изучение взаимосвязей факторов фолликулогенеза, контролирующих рост и развитие клеток яичников в разные периоды жизни, имеет решающее значение для понимания физиологии яичников. Осознание этих процессов обеспечивает терапевтические инструменты для регулирования функции яичников.

Цель работы: выявление кисспептина, рецептора кисспептина, ароматазы и рецептора антимюллера гормона; оценка возрастной динамики синтеза названных факторов фолликулогенеза у детей в первые годы жизни; исследование их взаимосвязей друг с другом.

Для этого были поставлены следующие задачи:

- 1) Выявить факторы фолликулогенеза с помощью иммунофлуоресцентного анализа.
- 2) Установить площадь распространения экспрессии кисспептина, рецептора

кисспептина, ароматазы и рецептора антимюллера гормона в яичниках.

3) Установить корреляцию и оценить межгрупповые различия в экспрессии факторов фолликулогенеза в зависимости от возраста

4) Установить корреляции между экспрессией факторов фолликулогенеза.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. 1. Яичник

Строение. Снаружи дефинитивный яичник покрыт поверхностным (зачатковым, или герменативным) эпителием целомического типа. Эпителиоциты располагаются в один слой на тонкой базальной мембране и в разных участках имеют разную толщину. Над выступающими участками эпителий плоский, а в других – кубический или цилиндрический. В цитоплазме эпителиоцитов присутствуют микропиноцитозные пузырьки – свидетельства обменных процессов между гонадой и серозной жидкостью малого таза. Под эпителием находится белочная оболочка из плотной волокнистой соединительной ткани. Она имеет слоистое строение. Несмотря на кажущуюся регидность и плотность, эта оболочка легко перестраивается при овуляции.

В дефинитивном яичнике топографически различимы две зоны – корковое и мозговое вещество. Корковое вещество занимает периферическую часть и характеризуется присутствием овариальных фолликулов, атретических и жёлтых тел. Мозговое вещество расположено в центре и не имеет в своем составе названных структур. Здесь находятся крупные ветви овариальных сосудов, которые распадаются на более мелкие веточки, уходящие в корковое вещество. Стромальная часть коркового и мозгового вещества яичника представляет собой органоспецифическую рыхлую волокнистую соединительную ткань. В корковом веществе строма характеризует большое количество волокнистых элементов и клеток фибробластического ряда, компактно расположенных между фолликулами. В области мозгового вещества плотность расположения волокон более низкая, доминируют эластические волокна, идущие в различных направлениях. Среди клеточных элементов стромы встречается множество малодифференцированных форм, которые идентифицируются по отростчатой форме, высокому ядерно-плазматическому отношению, округлому ядру,

слабобазофильной реакции цитоплазмы. Это свидетельствует о том, что в овариальной строме присутствуют предшественники многих клеточных линий. Встречаются тонкие пучки гладкомышечных клеток, в паравазальных участках – тучные клетки, участвующие в регуляции проницаемости сосудистых стенок и аморфного вещества стромы. Их число заметно увеличивается накануне овуляции, когда развивается общий интерстициальный отёк яичника (Боровая 2011).

Развитие и гистогенез. В органогенезе яичника человека можно выделить три последовательных процесса: морфогенез гонад, первичную половую дифференциацию и окончательный гистогенез (Sforza et al. 2003). Зачаток гонад (индифферентная гонада), сформированный во время морфогенеза, развивается в примитивный яичник в процессе первичной половой дифференциации (Satoh 1991). Наконец, во время окончательного гистогенеза формируются фолликулы, типичные овариальные структуры, и примитивный яичник становится дифинитивным яичником. Во время окончательного гистогенеза (стадия компартментализации) паренхима подразделяется на примитивную наружную кору и внутреннее мозговое вещество. В коре образуются овариальные тяжи из плотного скопления клеток примитивной гонады. Эти тяжи (примитивная кортикальная ткань) являются первыми структурами, где взаимодействуют зародышевые и соматические овариальные клетки. Впоследствии овариальные тяжи распадаются на скопления зародышевых и соматических клеток, из которых будут развиваться первичные фолликулы (Sforza et al. 2003).

На 5-й неделе развития край (гребень) гонад идентифицируется как небольшой выступ на дорзальной целомической стенке, латеральнее аорты и медиальнее мезонефрального канала. В конце пятой недели развития, сопровождающейся миграцией первичных половых клеток в гонадный гребень, целомический эпителий разрастается и становится многослойным, образуя небольшое гонадное выпячивание. Многослойный целомический эпителий развивается в короткие столбы, образуя, таким образом,

тяжеобразные структуры, так называемые примитивные половые тяжи. Мезонефрические каналцы и клубочки располагаются непосредственно под целомическим эпителием. Целомические эпителиальные клетки не соприкасаются с мезонефросом. Некоторые первичные половые клетки, мигрировавшие в гонадный гребень, вступают в контакт с мезонефрическими каналцами. В местах контакта первичных зародышевых клеток с клетками мезонефроса ещё не наблюдается базальная пластинка и другие структуры банальной мембраны.

Зачатки гонад в начале шестой недели развития имеют более выраженное выпячивание в полость целома, а клетки, которые возникли из мезонефроса, располагаются вблизи верхней части гонады и пролиферируя, образуют веретенообразные структуры – первичные половые тяжи. Эти первичные половые тяжи ветвятся в дорсально-вентральном направлении и объединяются в гонадах. Каждый первичный половой тяж прилегает к мезонефросу, а в некоторых местах они соприкасаются или вступают в непосредственную близость с целомическим эпителием. На этом этапе примитивные половые тяжи целомического эпителия растягиваются и уплощаются в один или несколько слоев. Целомический эпителий не проявляет никакого ветвления, то есть примитивные половые тяжи не участвуют в формировании первичных половых тяжей. Также наблюдается перемещение первичных половых клеток в первичные половые тяжи. Базальная пластинка начинает обнаруживаться вокруг первичных половых тяжей, явно в дорзальной (базальной) области, но постепенно становилась менее отчетливой по мере приближения к целомическому эпителию. Везикулы, содержащие материал базальной пластинки, видны в клетках первичных половых тяжей. Десмосомы или десмосомо-подобные структуры (фокальные клеточные контакты) также были отмечены между клетками первичных половых тяжей в различных местах, включая области, в которых прерывалась базальная пластинка.

В середине шестой недели развития первичные половые тяжи удлинялся

и разветвлялся от базальной к периферийной области яичника. Они прилегают к мезонефросу, но не обнаруживают соприкосновения с целомическим эпителием, который сплюснут в один-три слоя. Базальная пластинка наблюдается вокруг первичных половых тяжей. Микровилли и десмосомы или структуры, подобные десмосоме, также присутствуют между первичными половыми тяжами.

На седьмой неделе развития отчётливо выражена пролиферация зародышевых клеток в дистальной (ближе к поверхности) части первичных половых тяжей и наблюдается общее увеличение этих тяжей. Первичные половые нити все еще смежны с мезонефросом, а те, которые расположены в базальной (ближе к мезонефросу) части яичника, растянуты. Целомический эпителий растягивается, вследствие расширения первичных половых тяжей, и, по-видимому, образует почти один слой.

На 13 неделе развития из-за интенсивной пролиферации первичных половых клеток происходит увеличение первичных половых тяжей. В связи с этими явлениями и новообразованием интерстициальной ткани в базальной части яичника, первичные половые тяжи претерпевают смещение в направлении периферийных областей яичника с образованием структур, которые в дальнейшем станут фолликулогенными половыми тяжами. Первичные половые тяжи, ранее присутствовавшие в этой базальной области яичника, расщепляются и фрагментируются на острова или кластеры, образуя rete ovarii (внутрияичниковую сеть). Многие фолликулогенные половые тяжи вблизи целомического эпителия проходят параллельно ему, при этом они более плоские, чем тяжи в центре яичника. Выявляется ветвление фолликулогенных половых тяжей от центра к периферии яичника, как и в первичных половых тяжах на предыдущих этапах. На этой стадии не наблюдается исчезновения первичных половых тяжей, что было бы подтверждено накоплением клеточных остатков или вторичных лизосом, особенно в базальной части яичника или так называемом мозговой веществе. Целомический эпителий почти полностью окружается базальной пластиной.

Не наблюдается пролиферации целомических эпителиальных клеток в субэпителиальную область яичника. Также наблюдаются участки контакта между фолликулогенными половыми тяжами и целомическим эпителием через примордиальные зародышевые клетки.

На 18-й неделе развития в фолликулогенных половых тяжах отмечается много сильно пролиферирующих половых клеток и оогоний. Прилегающий интерстиций сжимается, в связи с увеличением объёма фолликулогенных половых тяжей. Кластеры первичных половых тяжей и rete ovarii присутствуют в базальной части яичника (Sato 1991).

Незрелые яичники имеют различную форму; макроскопически все они удлинённые, тонкие и довольно плоские. Их поверхность неровная, с углублениями, а также выпуклостями, которые образованы антральными фолликулами, выступающими над поверхностью. В поперечном сечении яичники имеют сердцевидную, грибовидную или клеверовидную форму. Диаметры яичников увеличиваются во время внутриутробного и постнатального органогенеза, в то время как длина достигает максимума примерно на третьем месяце после рождения. Следовательно, форма яичников становится более объёмной с возрастом. Объёмы яичников увеличиваются постепенно во время всего внутриутробного и постнатального органогенеза. Объём яичников, рассчитанный по разным методам изменяется от 25 до 380 мм³ с 15-кратным увеличением, либо от 16 до 300 мм³ в конце процесса с 20-кратным увеличением по сравнению с первоначальным объёмом (с 15-й недели развития по 10-й месяц после рождения). Длина, за этот же период, увеличивается от 8.7 мм до 12 мм у 10-ти месячного ребёнка (Sforza et al. 2004).

Начиная примерно с 15-й недели развития по достижению 8 месячного возраста на долю коркового вещества приходится большая часть органа, от 76% до 93% от общего объёма. Первоначальная (примитивная) кортикальная ткань занимает большую часть объёма всей коры яичников плода. Причём у плодов примитивная кортикальная ткань занимала немного больший объём у

правого яичника, по сравнению с левым яичником, в то время как для доли мозгового вещества наблюдались большие различия между яичниками. Примитивная кортикальная ткань достигает максимума около 65% между 19-й и 20-й неделями развития, затем уменьшается до 16% при рождении и продолжает снижаться после этого, составляя только 0,3% у 8 месячного ребёнка (Forabosco and Sforza 2007).

Яичники новорожденных (1 – 14 дней) уже состоят из наружного коркового и внутреннего мозгового вещества. Кора состоит из однослойного, обычно кубического наружного эпителия, под которым тонкая, не обязательно сплошная белочная оболочка покрывает слой раздробленной, неравномерно толстой примитивной кортикальной ткани. Этот слой содержит зародышевые и соматические клетки, тесно взаимодействующие и окруженные интерстициальной тканью, состоящей из мезенхимных клеток и обильного аморфного межклеточного вещества. Большинство зародышевых клеток обнаруживаются в виде ооцитов на разных стадиях первой мейотической профазы, как одиночные, так и в синцитиальных кластерах клеток. Оогонии чрезвычайно редки. Примордиальные фолликулы выходят из синцитиальных скоплений и во многих случаях остаются тесно взаимосвязанными. Позднее синцитиальные скопления ооцитов постепенно сменяются фолликулами на разных стадиях созревания, которые простираются до предела внутреннего мозгового вещества. Массы примитивных зародышевых тканей составляют 10-20%. Внутреннее мозговое вещество, составляющее 10-30% от органа, богато нервами и сосудами, нерегулярно по форме и простирается до интерстиция наружного коркового вещества (Forabosco et al. 1991). В коре доля интерстиция или стромы постепенно возрастает с возрастом: 25% на 20-й неделе, 45% при рождении, 50% на 8-м месяце.

Доля примордиальных фолликулов также постепенно увеличивается в яичнике по мере развития: 2,7% на 19 неделе, 5,8% на 20 неделе, 9% на 25, причем их наибольший процентный объем наблюдается при рождении – в среднем 16,5%. Что касается последующих этапов развития фолликула, то

ранние первичные фолликулы наблюдаются уже в 20-недельных яичниках, и во всех неонатальных и постнатальных яичника. Вторичные фолликулы также наблюдаются в неонатальных яичника. Плотность примордиальных фолликулов быстро возрастает между 15 и 25 неделями развития, удваиваясь в количестве на единицу объема (от 3900 до 8000 фолликулов/мм³ коры яичника) (Forabosco and Sforza 2007). Число фолликулов достигает максимума на 26 неделе гестации при развитии плода. После этого пика в количестве фолликулов во время внутриутробной жизни следует снижение этого числа до рождения. Так как утрата большинства фолликулов происходит после начала их созревания, это значит, что самые высокие уровни фолликулярного отбора также происходят в тот же период (Geber et al. 2012). Фолликулярная плотность постепенно уменьшается, достигая в среднем 3100 фолликулов/мм³ при рождении, а затем снижается до 1400 фолликулов/мм³ на 8-м месяце после рождения. Однако, так как в течение этого периода яичник увеличивается в размерах, общее количество примордиальных фолликулов на яичник увеличивается от 15-й недели развития до момента рождения и остается примерно таким же в 8 месяцев.

Примордиальные фолликулы численно преобладают и составляют около 95% всех фолликулов (Forabosco and Sforza 2007). Их средний диаметр составляет 45,58 мкм, тогда как ооцит внутри них имеет средний диаметр 35,28 мкм и ядро 19,40 мкм. Фолликулы, содержащие два ооцита или двуклеточный ооцит, составляют не более 3% от общего числа фолликулов (A Forabosco et al. 1991). Первичные фолликулы менее распространены, чем примордиальные. Их средняя плотность в неонатальных яичниках составляет 140/мм³ коры яичника, а общее число в неонатальных яичниках колебалось между 3,8 и 5,7% от общего числа фолликулов (т. е. суммы примордиальных и первичных фолликулов), со средним значением 4,7%. Это общее количество включает примерно один первичный на каждые 22 примордиальных фолликула. На 8-м месяце после рождения как плотность на единицу объема коры, так и общее число первичных фолликулов уменьшились до 34/мм³

овариальной коры, что соответствует 2,3% от общего фолликулярного объёма (Forabosco and Sforza 2007). Их средний диаметр составляет 56,82 мкм, тогда как у ооцита - 37,43 мкм. В постнатальных яичниках вторичные и третичные фолликулы представлены единичными случаями. Средний диаметр вторичных фолликулов составляет 76,12 мкм, а диаметр ооцита 46,94 мкм. Средние диаметры третичных фолликулов в разрезе составляют соответственно 74,61 мкм для ооцита и 29,07 мкм для его ядра (Forabosco et al. 1991).

Овариальный резерв, то есть общее количество примордиальных фолликулов на каждого индивидуума, составляет (в обоих яичниках) 100 000 на 15 неделе после зачатия и постепенно увеличивался до 680 000 на 34 неделе (к моменту рождения). Овариальный запас у новорожденных колебался от 350 000 до 920 000 примордиальных фолликулов, со средним значением в 650 000. В 8-ми месячном возрасте примордиальные фолликулы все еще насчитывают около 680 000 (Forabosco and Sforza 2007).

Фолликулогенез и его регуляция. Фолликулогенез включает 4 главных события: отбор примордиальных (покоящихся) фолликулов для продолжения развития (вступления в рост); переход примордиальных фолликулов в преантральные формы; последующее развитие антральных фолликулов, селекцию доминантного фолликула, заканчивающуюся овуляцией. В продолжение каждого из указанных событий большинство фолликулов, вступивших в рост, погибает (подвергается атреции), а presumptively доминантный фолликул продолжает развитие (Боровая 2011).

Основной функциональной единицей в яичнике является овариальный фолликул, который состоит из соматических клеток и развивающегося ооцита. Способность соматических клеток в гонаде контролировать и поддерживать процесс гаметогенеза является важным требованием для размножения. Двумя основными типами соматических клеток в фолликуле яичников являются тека-клетки и гранулезные клетки. Эти два типа соматических клеток являются местом действия и синтеза ряда гормонов, которые способствуют комплексной регуляции развития фолликулов. Пролиферация этих двух типов

клеток частично отвечает за развитие антрального овариального фолликула. Клетки гранулезы являются основным типом клеток в яичнике, которые обеспечивают физическую поддержку и микроокружение, необходимые для развития ооцита. Клетки гранулезы активно дифференцируются и образуют несколько особых популяций. В процессе фолликулогенеза происходит изменение клеточной дифференциации от примордиальной стадии развития через овуляцию до лютеиновой стадии развития. Регулирование цитодифференцировки клеток гранулезы требует действий ряда гормонов и факторов роста. Конкретные рецепторы были продемонстрированы на гранулезных клетках для гонадотропинов – лютеинизирующего (ЛГ) и фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов. Кроме того, были обнаружены рецепторы факторов, таких как эпидермальный фактор роста (EGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF) и ингибирующее вещество Мюллера. Действие этих гормонов и факторов роста на гранулезные клетки изменяется в зависимости от стадии дифференцировки. Биосинтез двух важных стероидов яичников, эстрадиола и прогестерона, является основной функцией гранулезных клеток у таких видов, как корова, человек и грызуны. Биосинтез эстрогенов происходит по мере развития фолликула и дифференцировки клеток гранулезы. Этому способствует ФСГ посредством цАМФ. По мере того как фолликул достигает предовуляторной стадии развития, клетки гранулезы развивают повышенную способность синтезировать и секретировать прогестины под контролем ЛГ. В отличие от преантральных и антральных фолликулов, гранулеза ранних примордиальных фолликулов является независимой от гонадотропинов и стероидных гормонов и нестероидогенной.

Другим важным типом клеток в яичнике являются тека-клетки. Это дифференцированные стромальные клетки, которые окружают фолликул, также ещё называемые интерстициальными клетками. Внутренний слой этих клеток (*theca interna*), имеет базальную мембрану, отделяющую его от внешнего слоя гранулезных клеток. Одной из основных функций тека-клеток у таких видов, как корова, человек и грызуны, является секреция андрогенов.

Тека-клетки реагируют на ЛГ, увеличивая производство андрогенов из холестерина. В этих клетках также продуцируются прогестины под контролем гонадотропинов. На стадии примордиальных фолликулов нет никаких клеток теки; однако во время перехода к стадии первичных фолликулов клетки теки (т.е. нестероидные клетки-предшественники) окружают фолликул. Как и в случае клеток гранулезы примордиальных фолликулов, тека-клетки на этой стадии развития являются гонадотропин- и стероиднезависимыми и сами не продуцируют стероидов. Формирование и связывание клеток теки с развивающимися примордиальными фолликулами является критическим для большинства видов млекопитающих, включая человека. Еще одним ранним событием в процессе фолликулогенеза является отбор клеток теки из стромально-интерстициальной клеточной популяции и последующая пролиферация как гранулезных, так и тека-клеток. Факторы, вырабатываемые клетками гранулезы, могут быть вовлечены в набор и последующую пролиферацию клеток теки. Эпителиальные клетки не развиваются или дифференцируются в отсутствие соседних мезенхимных клеток.

Женщины рождаются с пулом примордиальных фолликулов или ооцитов. Пул представляет собой полный запас ооцитов, которые могут потенциально развиваться и овулировать. После начала развития примордиального фолликула (главная репродуктивная единица яичников), фолликулы подвергаются овуляции или дегенерации через атрезию. Когда запас ооцитов (то есть примордиальных фолликулов) уменьшается, менструальная цикличность затухает и наступает менопауза. Примордиальные фолликулы состоят из одного ооцита и, как правило, неполного слоя плоских (т.е. сплюснутых) предгранулезных эпителиальных клеток, расположенных на базальной мембране (Skinner 2005). Базальная мембрана и фолликулярные эпителиоциты создают первичное микроокружение для овоцита, исключая его контакт с другими клетками и системой крови. Примордиальные фолликулы не имеют регионального кровоснабжения, и поэтому их связь с эндокринной системой весьма ограничена (Боровая 2011).

Примордиальные фолликулы существуют в стромально-интерстициальной клеточной среде без видимых слоев клеток теки или организованной мезенхимной ткани, окружающей фолликулы. Большинство примордиальных фолликулов существуют в состоянии покоя с ооцитом, находящимся в блоке профазы 1-го деления мейоза (Skinner 2005). Полагают, что стимулом для вступления очередной группы примордиальных фолликулов в рост в течение конкретного цикла является величина общей популяции покоящихся фолликулов, присутствующих в яичнике. Согласно гипотезе трофического градиента, примордиальные фолликулы, расположенные в хорошо кровоснабжаемых участках, имеют наибольшие шансы для возобновления развития. Вблизи такого, начавшего рост, фолликула в отдельных участках стромы регистрируются своеобразные реактивные зоны роста, состоящие из молодых активных фибробластов и гладкомышечных клеток, богатых гликогеном, гликозамингликанами и рибонуклепротеидами. Эпителиоциты примордиального фолликула, прилежащие к этим зонам, рано гипертрофируются, принимают кубическую или цилиндрическую форму, в то время как в других участках фолликулярной стенки остаются мелкими и плоскими (Боровая 2011). Изменения в форме гранулезных клеток являются одним из начальных событий в развитии первичного фолликула. В результате переход от примордиальных к первичным фолликулам приводит к образованию ооцита с увеличенным диаметром и одним слоем кубических гранулезных клеток (Skinner 2005).

Вступление примордиальных фолликулов в рост и развитие первичного фолликула координируются локально произведенными паракринными и аутокринными факторами роста. Были также выявлены эндокринные факторы, такие как прогестерон, которые влияют на сборку фолликулов. Локально продуцируемые факторы, которые способствуют переходу от примордиального к первичному фолликулу, включают факторы роста, такие как kit-лиганд (производное фолликулярных эпителиоцитов) (KL) – влияет на клетки теки и ооцит; клетки теки (первичных и вторичных фолликулов)

производят трансформирующий фактор роста альфа (TGF- α), фактор роста кератиноцитов (KGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), ингибирующий лейкоз фактор (LIF) – оказывают регуляторное воздействие на клетки гранулезы; основной фактор роста фибробластов (bFGF), костные морфогенетические белки (BMPs) – производные овоцита. Были идентифицированы факторы, опосредующие взаимодействия клеток-предшественников теки-гранулезы и взаимодействия гранулезы и ооцитов. Фактор, синтезируемый преантральными и антральными фолликулами, мюллеровское ингибирующее вещество, может ингибировать переход от примордиального к первичному фолликулу. Наблюдения показывают, что для контроля перехода от примордиального к первичному фолликулу требуется сложная сеть межклеточных взаимодействий (Skinner 2005). Переход от примордиального фолликула к первичному отличается от последующего развития фолликула из-за относительной независимости от гормонов и менее дифференцированных клеточных популяций.

Первичные однослойные фолликулы. Их средний диаметр составляет 100 мкм. Наиболее важными событиями в развитии первичных однослойных фолликулов из примордиальных являются: экспрессия рецепторов ФСГ; возобновление роста овоцита; появление прозрачной зоны; начало дифференцировки фолликулярной оболочки. Начиная с момента вступления примордиального фолликула в рост и в течение всего преантрального периода фолликулогенеза овоцит увеличивается в диаметре от 25 мкм до 120 мкм (проходит стадию большого роста). Такая гипертрофия связана с реактивацией генома половой клетки, потенциальным промотером которой служит kit-лиганд. По мере возобновления роста овоцита начинают транскрипцию некоторые мРНК и образуются белки, способствующие увеличению размеров и дифференцировке овоцита. Активируются гены, кодирующие синтез белковых компонентов прозрачной зоны. В первичном фолликуле прозрачная зона достаточно хорошо выражена. Она сохраняется до начала имплантации зародыша и выполняет ряд важных функций. Прозрачная

зона достаточно прочная, но вместе с тем эластичная. По мере развития овоцита она утолщается. Проницаема для микросоединений, но является барьером для макромолекул, обеспечивая защиту овоцита. Большинство ее компонентов образуется овоцитом.

По мере развития первичные фолликулы увеличиваются не только за счет роста овоцита, но и за счет пролиферации фолликулярных эпителиоцитов. Последние гипертрофируются и изменяют свою форму на кубическую или цилиндрическую. На ранних этапах развития первичных фолликулов увеличение численности фолликулярных эпителиоцитов возможно за счет встраивания новых элементов из расположенных рядом тяжей клеток. Важным событием в развитии первичных фолликулов является образование межклеточных контактов щелевого типа между овоцитом и клетками фолликулярного эпителия. Синтез коннексина-37 (Cx-37), из которого формируются эти контакты, овоцит начинает сразу после отбора примордиального фолликула для вступления в рост. Как и в примордиальном фолликуле, овоцит первичного однослойного фолликула пребывает в состоянии блока мейоза, несмотря на существенную активацию роста.

По мере пролиферации фолликулярный эпителий растущего фолликула становится многослойным, и он получает название первичного многослойного фолликула. Его средний диаметр 200 мкм. Кнаружи от базальной мембраны постепенно концентрируются соединительнотканые клетки, создающие новую оболочку – презумптивную теку фолликула; в более крупных многослойных фолликулах тека дифференцируется на внутреннюю и наружную части. Полагают, что процесс образования теки регулирует белковое производное фолликулярных эпителиоцитов – текальный организатор. Формирование теки знаменует начало регионального кровоснабжения и иннервации овосоматического гистиона фолликула. Генеральная концепция последних лет: в регуляции преантральных стадий фолликулогенеза главную роль играет сам овоцит. Овоциты первичных многослойных фолликулов завершают рост.

Полостной (антральный) фолликул, представляющий собой следующую стадию фолликулогенеза, помимо прочих особенностей, характеризуется наличием полости с фолликулярной жидкостью в составе фолликулярного эпителия, асимметричным расположением овоцита, дифференцированной на внутреннюю и наружную части эндокринноактивной текой. Фолликулярная жидкость образуется частично за счет экссудации плазмы, частично – за счет секреторной деятельности фолликулярных эпителиоцитов и овоцита. Эта среда играет важную роль посредника в разнообразных процессах между овоцитом и соматическими клетками фолликула, а также обеспечивает работу интрафолликулярного механизма регуляции фолликулогенеза.

Полостные фолликулы имеют разные размеры, что связано со степенью их зрелости. Различают 4 стадии полостных фолликулов. В яичниках человека каждый презумптивный доминантный фолликул проходит все эти стадии: от мелкого полостного фолликула (1-6 мм в диаметре) к среднему (7-11 мм), крупному (12-17 мм) и преовуляторному (18-23 мм). Атрезия полостных фолликулов случается чаще на стадиях мелких и средних форм. Размер полостного фолликула зависит в основном от размера полости, который, в свою очередь, определяется объемом фолликулярной жидкости. Последний варьирует в широких пределах: от 0,02 мл в мелких полостных фолликулах до 7 мл в преовуляторных. Увеличению размера полостного фолликула способствует продолжающаяся активная пролиферация фолликулярных эпителиоцитов. В презумптивно доминантном полостном фолликуле фолликулярные и текальные клетки делятся особенно интенсивно и согласованно с увеличением объема фолликулярной жидкости. Усредненными физиологическими параметрами преовуляторного фолликула у человека считаются: диаметр фолликула около 25 мм, количество клеток в составе фолликулярного эпителия – 5 млн, объем фолликулярной жидкости – 7 мл. В наружной теке развивающегося полостного фолликула постепенно возрастает число гладкомышечных клеток, иннервируемых автономными (вегетативными) нервным сплетениями. Во внутренней теке полостных

фолликулов присутствует популяция крупных эпителиоидных клеток – текальных интерстициальных эндокриноцитов, имеющих характерные для стероидпродуцирующих клеток ультраструктурные признаки - липидные включения, митохондрии с тубулярным типом крист, развитую агранулярную эндоплазматическую сеть. Текальные интерстициальные эндокриноциты (ТИЭ) имеют рецепторы для лютропина (ЛГ) и инсулина. Ко времени формирования полости в фолликуле текальные интерстициальные эндокриноциты начинают экспрессировать целый каскад генов – ЛГ-рецепторов, рецепторов инсулина, липопротеинов, StAR, p450 ароматазы и в ответ на действие ЛГ и инсулина приобретают способность продуцировать андростендион.

Пространственная организация клеток фолликулярного эпителия в структуре полостного фолликула позволяет выделить 4 подтипа - мембранный (клетки, лежащие на базальной мембране фолликула), периантральный (клетки, пограничные с полостью фолликула), кумулюсный подтип и подтип лучистого венца. Во время развития полостного фолликула все подтипы клеток активно экспрессируют рецепторы для ФСГ, и каждая группа клеток оказывает свое специфическое влияние на фолликулярное развитие соответственно тому, какие гены активируются в ее ядре в ответ на действие фоллитропина. Так, мембранные клетки экспрессируют p450 ароматазу и ЛГ-рецепторы, к чему не способны другие клеточные подтипы. Путь, который проходят фолликулярные эпителиоциты в процессе дифференцировки полостного фолликула, контролируется градиентом морфогенов, образующихся в овоците. В опытах на лабораторных животных показано, что различия в активности метаболизма и специфического белкового синтеза фолликулярных клеток разной локализации контролируются двумя известным овоцитарными морфогенами - GDF-9 и BMP-15 (Боровая 2011). Фактор дифференциации роста-9 (GDF-9) является членом семейства TGF β и экспрессируется ооцитами на начальной стадии развития фолликулов. GDF-9 гомолог GDF-9B был идентифицирован как BMP-15. Синергические действия

GDF-9 и BMP-15 играют важную роль в взаимодействии ооцитов и клеток кумулюса в развивающихся фолликулах. Мыши с нокаутом по GDF-9 имеют блок развития фолликулов на начальной стадии. GDF-9 может влиять на экспрессию фактора роста фолликула – KL и ряда других генов гранулезных клеток. Первоначально GDF-9 экспрессируется в первичных фолликулах. (Skinner 2005). В процессе развития полостного фолликула данные морфогены действуют на фолликулярные эпителиоциты как градиентные сигналы, способствующие генерации вышеназванных клеточных подтипов.

В теке антральных фолликулов имеется собственная сосудистая сеть, состоящая из одной-двух приносящих артериол, распадающихся на капилляры. В периферических участках теки располагаются сосудистые коллекторы фолликула – собирательные венулы и лимфокапилляры. По мере развития антральных фолликулов возрастает активность адренергической иннервации теки. Наиболее важным регулятором синтеза андростендиона в текальных оболочках полостных фолликулов является ЛГ. Сигнальный путь действия лютропина включает связывание с ЛГ-рецепторами – образование цАМФ – активацию протеинкиназы – индукцию экспрессии специфических генов, задействованных в биосинтезе андростендиона. Синергистами ЛГ в регуляции цитодифференцировки текальных интерстициальных эндокриноцитов являются инсулин и липопроотеины. В текальных эндокриноцитах человека экспрессируются рецепторы инсулина с протеин-тирозин-киназной активностью, благодаря которым реализуется путь передачи сигнала, потенцирующего синтез андростендиона. Таким образом, инсулин может увеличивать синтез андрогенов как непосредственно, так и в роли синергиста ЛГ. Идея о стимуляторном эффекте инсулина подтверждается тем, что при гиперинсулинемии у женщин всегда имеет место гиперандрогенизм. Липопроотеины являются потенциальными стимуляторами продукции андрогенов, благодаря способности увеличивать содержание внутриклеточного холестерина, который с участием StAR и P450 трансформируется в андростендион. Помимо инсулина и липопроотеинов на

образование андростендиона существенно влияют активин, инсулиноподобный фактор роста-1, GDF-9, BMP-4 (Боровая 2011).

1. 2. Факторы фолликулогенеза

1. 2. 1. Ароматаза

Биосинтез эстрогенов катализируется микросомальным членом надсемейства ферментов, известных в совокупности как цитохром P450, а именно, цитохром P450 ароматазой (Thompson Jr. and Siiteri 1974). Этот гемсодержащий белок отвечает за связывание стероидного субстрата C19 и катализирует серию реакций, приводящих к образованию фенольного кольца A, характерного для эстрогенов. Он кодируется геном CYP19, локализованным на хромосоме 15p21.1 (Chen et al. 1988). Связанным с ароматазой является флавопротеин, NADPH-цитохром P450 редуктаза (Simmons et al. 1984), который есть в эндоплазматическом ретикулуме большинства типов клеток и ответственен за перенос восстановительных эквивалентов из NADPH в любую микросомальную форму цитохрома P450, с которой он приходит в контакт. В то время как редуктаза может быть продуктом единственного гена, цитохром P450 ароматаза является членом обширного суперсемейства генов, а именно семейства цитохрома P450, которое содержит более 220 охарактеризованных членов, принадлежащих к 36 семействам генов. В рамках этого цитохром P450 семейства ароматаза является единственным членом семейства 19, обозначенного CYP19. Это обозначение основано на том факте, что угловая метильная группа C19 является местом атаки кислорода (Nelson et al. 1993). Человеческая ароматаза состоит из группы гема и полипептидной цепи из 503 остатков аминокислот (Ghosh et al. 2009). N-концевой участок молекулы, особенно аминокислотные остатки 10-20 важны для сохранения активной конформации фермента, являясь, в некотором роде, критической областью, поскольку, если отщепление первых 10 аминокислот мало влияет на активность человеческой ароматазы, то отщепление 20 аминокислот уже приводит к снижению её

активности более, чем на 95%. (Amarneh et al. 1993). Каталитический центр содержит следующие остатки: Ile 305, Ala 306, Asp 309 и Thr 310 из I - спирали, Phe 221 и Trp 224 из F-спирали, Ile 133 и Phe 134 из В-С петли, Val 370, Leu 372 и Val 373 из К-спираль-β3 петли, Met 374 из β3 петли, Leu 477 и Ser 478 из петли β8-β9. Гидрофобные остатки аминокислот и порфириновые кольца гема плотно упаковываются напротив стероидной цепи, образуя полость, комплементарную форме связанного стероида. Наличие семи цистеинов в восстановленной форме говорит о том, что основная часть ароматазы, вероятно, находится в восстановительной среде цитоплазмы. Гидрофобный участок последовательности ароматазы предполагает липидную интеграцию для остатков 21-42 и 49-71, тем самым помещая N-конец с гликозилированным Asn 12 на противоположную сторону, то есть в люмен ЭПР.

Ароматаза цитохрома P450 является единственным ферментом позвоночных, который катализируют биосинтез эстрогенов из андрогенов. В результате трехступенчатой реакции, каждый этап которой требует 1 моль O₂, 1 моль НАДФН (Thompson and Siiteri 1974), и связывания с окислительно-восстановительным партнёром - цитохром P450 редуктазой, ароматаза преобразует андростендион, тестостерон и 16α-гидрокситестостерон в эстрон, 17β-эстрадиол и 17β,16α-эстриол, соответственно. Первые два этапа реакции это гидроксилирование C19 метильных групп, а третий, включающий в себя ароматизацию стероидного А-кольца, уникален для ароматазы. Принимая во внимание, что большинство цитохромов P450 не являются высоко селективными, следует отметить, что андрогенная специфичность является отличительным признаком, который обособляет ароматазу (Ghosh et al. 2009).

Эстрогены имеют решающее значение для женской и мужской фертильности, о чем свидетельствуют серьезные нарушения репродуктивной функции, наблюдаемые при блокировании их синтеза (Simpson 2004) или действия (Schomberg et al. 1999). В яичнике местно произведенный эстрадиол действует совместно с гонадотропинами, секретируемыми из передней доли гипофиза, чтобы обеспечить успешный фолликулогенез и продукцию

стероидов. С другой стороны, своевременный синтез ароматазы в фолликуле яичников также отвечает за циклические изменения уровней эстрадиола в сыворотке. Эти изменения модулируют структуру и функцию женского репродуктивного тракта, включая яйцеводы, матку и влагалище. Эти эндокринные изменения необходимы также для выживания ооцитов, оплодотворения и имплантации зародыша (Korach et al. 2003). Колебания в циркулирующем эстрадиоле также устанавливают характерный женский рисунок секреции гонадотропина из гипофиза (течение менструального цикла). Более того, сильная экспрессия ароматазы в преовуляторных фолликулах приводит к генерации всплеска лютеинизирующего гормона (ЛГ), который вызывает овуляции (Naftolin et al. 2007). Таким образом, своевременная и клеточная экспрессия ароматазы в яичнике имеет решающее значение для аутокринной регуляции фолликулогенеза, эндокринного контроля женского репродуктивного тракта и координации секреции гонадотропинов.

Этот эффект эстрадиола был четко продемонстрирован у мышей с нокаутом гена ароматазы и эстрогенового рецептора (ER). При нокауте ароматазы (ArKO) развитие фолликула останавливается на стадии перед овуляцией, и не образуются желтые тела (Fisher et al. 1998). Более того, хотя мыши-ArKO содержат фолликулы на всех стадиях развития, антральные фолликулы являются аномальными, они имеют заполненную кровью антральную полость и высокий уровень апоптоза в клетках гранулезы (Britt et al. 2000). У нокаутированных по ER β мышей, напротив, антральные фолликулы являются нормальными, но нарушается стимуляция ФСГ и экспрессия ароматазы значительно снижается (Couse et al. 2005). В яичнике субстрат для ароматазы продуцируется клетками текальными клетками фолликула. Клетки теки, производящие андрогены также непосредственно участвуют в регуляции этого фермента. Было продемонстрировано, что тестостерон стимулирует экспрессию ароматазы в отсутствие ФСГ (Wu et al. 2011).

В ранних исследованиях четко установлено, что цАМФ является основным внутриклеточным мессенджером, опосредующим ФСГ-стимуляцию экспрессии ароматазы (Terada et al. 1984). Одной примечательной характеристикой эффекта ФСГ на экспрессию ароматазы является относительно длительное время (24-48 ч), необходимое для индукции мРНК ароматазы. Поскольку ФСГ стимулирует продукцию цАМФ очень быстро, предполагается, что для индукции ароматазы может потребоваться увеличение экспрессии регуляторных и каталитических единиц протеинкиназы А (РКА) или белков, синтезированных в результате активации РКА (Fitzpatrick and Richards 1991).

У многих видов яичники приобретают ферментативную способность продуцировать эстроген во время эмбриональной жизни, что определяется способностью плодных яичников к преобразованию радиоактивно меченого андрогена в эстрон и эстрадиол (F. W. George and Wilson 1978). Экспрессия ароматазы в эмбриональных яичниках крайне низка. Играет ли эта незначительная экспрессия ароматазы в яичниках плода какую-либо роль в регуляции развития яичников, неясно, так как эстрогены не являются критическими для нормального развития яичника. Ни делеция гена ароматазы (ArKO) (Fisher et al. 1998), ни мутации протеина ароматазы (Conte et al. 1994) не влияют на формирование яичников. Хотя в этих случаях материнские эстрогены могут компенсировать отсутствие локального синтеза эстрадиола, как например у нокаутных мышей с эстрогенными рецепторами α и β (ER α и β или Esr1 и Esr2) нет никаких дефектов развития эмбрионального яичника (J F Couse et al. 1999) что указывает на то, что, по крайней мере, у мышей, эстрогены не участвуют в этом процессе. Активность ароматазы и мРНК может быть обнаружена на 5 и 8 день после рождения в клеточном слое гранулезы растущих фолликулов (Mendelson and Kamat 2007).

В пределах слоя гранулезных клеток антральных фолликулов экспрессия ароматазы контролируется клеточно-специфическим, временным и пространственным образом, что приводит к градиенту экспрессии, где

концентрация ароматазы наиболее высока в клетках гранулезы на внешней стороне фолликула (муральных) по сравнению с клетками гранулезы, наиболее близкими к антральной полости. Более того, ароматаза не экспрессируется в клетках гранулезы кумулюса (Turner et al. 2002; Guigon et al. 2003). Физиологическое значение этого дифференциального выражения еще не ясно. В кумулюсных клетках гранулезы ароматаза замалчивается соединениями, производными ооцитов, такими как костный морфогенетический белок 15 (BMP-15) (Otsuka et al. 2001) и фактор дифференциации роста-9 (GDF9) (Spicer et al. 2006; Vitt et al. 2000), которые ингибируют вызванное ФСГ увеличение экспрессии ароматазы. Кроме того, у дефицитных GDF-9 мышей, которые проявляют остановку преантрального фолликулярного роста, происходит преждевременная экспрессия ароматазы в преантральных фолликулах (Elvin et al. 1999). Таким образом, отрицательные эффекты факторов, полученных из ооцитов, и стимулирующий эффект ФСГ устанавливают градиент экспрессии вдоль слоя клеток гранулезы преовуляторных фолликулов.

В клетках гранулезы мыши действия ФСГ значительно потенцируются инсулиноподобным фактором роста-1 (ИФР-1). ИФР-1 действует через его рецептор на клетки гранулезы, чтобы усилить индуцированную ФСГ стимуляцию активности ароматазы (Steinkampf et al. 1988). У мышей мРНК ароматазы встречается только в фолликулах имеющих рецепторы ИФР-1 и FSH (Zhou et al. 1997). Дополнительным свидетельством функциональной связи между системой ИФР-1 и стимуляцией ароматазы ФСГ является тот факт, что ИФР-связывающий белок (IGFBP-4) является сильным ингибитором ФСГ-зависимого продуцирования эстрадиола человеческими (Mason et al. 1998) гранулезными клетками. ИФР-1, вероятно, действует, главным образом, за счет увеличения способности клеток гранулезы реагировать на ФСГ, поскольку экспрессия рецептора ФСГ снижается при нокаут по ИФР-1 (Zhou et al. 1997). Однако в клетках гранулезы человека ИФР-1 сам по себе увеличивает продукцию эстрадиола до уровней, сравнимых с уровнями,

индуцированными ФСГ, хотя вместе эти гормоны также обладают синергическим эффектом (Erickson et al. 1989).

1. 2. 2. Рецептор антимюллерова гормона

Антимюллеров гормон (АМГ/АМН), также известный как ингибирующее вещество Мюллера (ИВМ/MIS) относится к суперсемейству трансформирующего фактора роста бета (ТФР- β /TGF- β) (Cate et al. 1986). Так как АМН является членом TGF- β семейства, предполагается, что он использует систему трансдукции сигнала, которая была идентифицирована для других факторов семейства, в частности, самого TGF- β , активина и костных морфогенетических белков (BMPs) (Nakao et al. 1997). АМН взаимодействует с гетеродимерной рецепторной системой, состоящей из двух отдельных однопроходных трансмембранных серин-треониновых киназ типа I и типа II (Lin and Lodish 1993). В этом комплексе рецептор типа II (AMHR, AMHRII, MISRII) отвечает за специфическое связывание лиганда (Mishina et al. 1996), в то время как рецепторы типа I (AMHRI, MISRI) также известные как активин рецептор-подобные киназы (Alks), более общие и опосредуют передачу сигнала при активации рецептора типа II (Jamin et al. 2003). Рецептор(ы) типа I долгое время оставались неизвестными, особенно в гонадах. По крайней мере, три рецептора типа I были тщательно изучены. Также было высказано предположение, что АМН может делить рецепторы типа I с другим членом семейства TGF. Первый идентифицированный рецептор типа I, Alk 6 (активин рецептор-подобная киназа 6) был выделен среди шести рецепторов типа I TGF- β семейства из-за его способности взаимодействовать лиганд-зависимым образом с AMHRII в клетках яичника китайского хомячка, экспрессирующих человеческий AMHRII (Gouédard et al. 2000). Alk 2 и Alk 3 были последовательно предложены в качестве возможной альтернативы рецепторов типа I (Di Clemente et al. 2003). Было показано, что Alk 6 и Alk 2, могут опосредовать действие АМН в разных клетках-мишенях (Visser et al. 2001),

тогда как Alk 3 только в мюллеровом протоке (Jamin et al. 2002). Активированный рецепторный комплекс фосфорилирует и активирует цитоплазматические Smad белки, которые транслоцируются в ядро и прямо или косвенно влияют на экспрессию генов. Этот BMP-подобный сигналинг опосредован, в основном, через молекулы Smad1, Smad5 и Smad8 (Gouédard et al. 2000; Visser et al. 2001; Clarke et al. 2001). Также были описаны другие сигнальные пути с участием β -катенина (Allard et al. 2000) и NF κ B (ядерный фактор κ B) (Segev et al. 2002). Однако и в настоящее время мало известно о возможных кофакторах, коактиваторах и корепрессорах для сигналинга АМН и его связи с другими путями трансдукции (Yoshida et al. 2014).

Ген АМНR-II у человека (hAMHR-II) расположен на хромосоме 12q13, имеет общую длину 8.7kbp, и состоит из 11 экзонов. Кодированный белок состоит из 573 аминокислот. (Imbeaud et al. 1995). Экзоны 1-3 кодируют внеклеточный домен, состоящий из 127 аминокислот в человеческом рецепторе, а экзон 4 кодирует трансмембранный домен, состоящий из 26 аминокислот. Последовательность АМНR-II примерно на 30% схода с другими рецепторами типа II в TGF- β семействе. Экзон 2, как представляется, важен для связывания лиганда, что было показано на рецепторе кролика. Общая структура АМНR II включает цистеиновый узел. Гомологичное моделирование hAMHR-II привело к открытию трёхпальцевого домена (три петли бета-шпилек). Было обнаружено, что, по сравнению с рецепторами активина, N-концевая петля пальца 1 длиннее в hAMHR-II. Как и в активиновых рецепторах, ядро структурного домена поддерживалось пятью дисульфидными мостиками, находящимися в непосредственной близости, но связи отличались. Растворимая поверхность hAMHR-II заряжена отрицательно. Также было показано, что его вогнутая поверхность, по-видимому, является обязательной для взаимодействия с АМН. При этом взаимодействии, две группы пептидов из hAMHR-II реагируют довольно сильно (регионы I и II), а третья (регион IV) в незначительной степени. Регионы I и II, соответствующие остаткам 4-15 и 34-42 расположены на двух

β -листах пальца 1 ближе к N-концу hAMHR-II. Регион IV, соответствующие остаткам 83-91, был сопоставлен с петлей пальца 3. Эти области, вероятно, представляют собой активный центр и характеризуются высоким содержанием гидрофобных остатков, которые, как правило, способствуют достижению связывания. Эти связывающие последовательности отличают AMHR-II от других представителей TGF- β семейства. Вероятно каждый член TGF- β имеет ярко выраженный активный центр (Salhi et al. 2004).

AMHRI почти повсеместно экспрессируется, в то время как AMHRII в основном обнаруживается в гонадах и других органах репродуктивного тракта. Также AMHRII присутствует, хотя и на разных уровнях, в 96% первичных гранулезоклеточных опухолях яичников (Anttonen et al. 2011). Он выявлен и в клеточных линиях ряда других опухолей. У самцов крыс в процессе эмбрионального развития, AMHR-II имеет пространственную и временную зависимость от регрессии мюллерова протока (Allard et al. 2000). У самок, экспрессия AMHR-II постоянно поддерживается на определенном уровне вдоль длины мюллерова протока и далее его производных, обнаруживаясь даже при беременности (Salhi et al. 2004). Во время стадии первичной половой дифференциации AMH не экспрессируется в яичнике. AMH впервые экспрессируется в гранулезных клетках рекрутированных примордиальных фолликулов, т.е. первичных фолликулов, которые обнаруживаются в яичниках плода человека после 36 недель гестации (Rajpert-De Meyts et al. 1999). Во время фолликулогенеза, экспрессия AMH начинается в клетках гранулезы примордиальных фолликулов, является самой высокой в зернистых клетках преантральных и малых антральных фолликулов, и постепенно уменьшается в последующих стадиях развития фолликулов. AMH продуцируется зернистыми клетками пока фолликул не достигнет нужного размера и степени дифференциации. В этом дифференцированном состоянии, фолликулы выбираются для доминирования под действием фолликулостимулирующего гормона (Visser et al. 2001; Visser and Themmen 2005).

Существуют различные известные параметры для оценки овариального резерва, в том числе, количество антральных фолликулов, фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и ингибина В, а также АМН (Yoshida et al. 2014). Исследования мышей, нокаутированных по гену АМН показали, что фолликулы начинают созревать более быстрыми темпами, чем обычно, так как они становятся более чувствительными к ФСГ (Durlinger et al. 2001). Это свидетельствует о тормозящей роли АМН в наборе примордиальных фолликулов, следовательно его отсутствие приводит к преждевременному истощению фолликулярного пула и к более раннему наступлению менопаузы (Yoshida et al. 2014). При этом самки мышей дефицитные по АМНRII или АМН являются и фертильными, как и обычные молодые половозрелые особи (Salhi et al. 2004). Ряд исследований женщин с нормальной овуляцией выявил ассоциацию однонуклеотидных полиморфизмов АМН и АМНRII с уровнем эстрадиола в течение ранней фолликулярной фазы менструального цикла, предполагающую роль АМН в регуляции чувствительности ФСГ. Было показано, что ряд гомозиготных мутаций (однонуклеотидных замен) по АМНRII способен влиять не только на овариальный резерв, но на успешное течение беременности (Yoshida et al. 2014), другие мутации по АМН и АМНRII вносят вклад в индивидуальные вариации порога чувствительности яичника к ФСГ (Kevenaar et al. 2007). У пациентов, страдающих от нормогонадотропного и нормоэстрогенного ановуляторного бесплодия, эти полиморфизмы могут стать ценными прогностическими факторами, которые определяют индивидуальный порог ФСГ. Существует ещё одно клиническое значение АМНRII. Ряд авторов продемонстрировал, что на клеточные линии эпителиальных и других опухолей яичника, в которых функционирует АМНRII, АМН оказывает тормозное действие. Показано, что АМН может связываться с 56% полученных культур асцитных клеток и вызывает торможение роста в 82% из них. Эти результаты были подтверждены и расширены с использованием различных раковых клеточных линий человека. При этом был выявлен очень

специфичный профиль экспрессии AMHRII в злокачественных опухолях человека, особенно при новообразованиях яичников. Эта тормозная функция AMH может свести к минимуму побочные эффекты лечения системных раковых заболеваний ориентированных на систему AMH-AMHR II. Таким образом, AMHRII является новой перспективной мишенью для лечения AMHRII-положительных эпителиальных опухолей яичника (Anttonen et al. 2011; Masiakos et al. 1999).

1. 2. 3. Лиганд–рецепторная система кисспептина

KISS1 ген, кодирующий кисспептины первоначально был идентифицирован в 1996 году в качестве супрессора метастазирования злокачественной меланомы человека (Lee et al. 1996). Ген KISS1 локализован в хромосоме 1q32 и имеет четыре экзона, первые два из которых не транслируются. Ген кодирует пептид предшественник из 145 аминокислот, который расщепляется до 54 аминокислотного белка (West et al. 1998). Из-за своих ингибирующих метастазирование свойств, 54 аминокислотный транскрипт был назван метастин (Ohtaki et al. 2001). Этот пептид может быть дополнительно расщеплен до 14, 13 и 10 аминокислотных пептидов. Как 54 аминокислотный, так и более короткие пептиды относятся к RF амидной группе пептидов (RFamide peptide family), так как имеют особую C-концевую последовательность Arg-Phe-NH₂, и в настоящее время совместно называются кисспептинами (Kotani et al. 2001). В 2001 году кисспептин был идентифицирован в качестве лиганда для рецептора 54 (GPR54), связанного с G-белком, который впервые был описан в головном мозге крыс (Lee et al. 1999), а затем и человека (сначала названный AXOR12 (Muir et al. 2001) и hOT7T175 (Ohtaki et al. 2001)) и в настоящее время называемый KISS1R (Gottsch et al. 2010). Ген KISS1R находится на хромосоме 19p13.3 и включает в себя пять экзонов, кодирующих белок, состоящий из 398 аминокислот, с семью гидрофобными трансмембранными доменами (Muir et al. 2001). Он имеет аминокислотную последовательность, близкую к семейству рецепторов

галанина (40% идентичности), хотя он не связывает галанинин или галанин-подобный пептид (Lee et al. 1999). После связывания кисспептина, KISS1R активирует фосфолипазу C, которая производит два вторичных внутриклеточных мессенджера - инозитолтрифосфат и диацилглицерол, а те, в свою очередь, опосредуют высвобождение кальция и активацию протеинкиназы C, которая далее опосредует распространение сигнала (Muir et al. 2001). Активация KISS1R приводит к двухфазному увеличению внутриклеточного кальция, с быстрым увеличением – первая фаза, за которой следует более устойчивая вторая фаза. Для поддержания второй фазы и, следовательно, подкрепления сигналинга кисспептина, рецептор совершает закономерные перемещения, включающие в себя интернализацию, рециркуляцию и набор из внутриклеточного пула, если это необходимо. Без этих процессов рецептор подвергается десенсибилизации после первоначальной высокой фазы (Min et al. 2014).

Первоначальные исследования нейроанатомического распределения кисспептиновых нейронов в человеческом мозге показали локализацию экспрессии кисспептина только в воронкообразном ядре гипоталамуса (Romero et al. 2007). Более позднее исследование подтвердило локализацию большинства клеточных тел кисспептиновых нейронов в воронкообразном ядре, но также показало вторую плотную популяцию клеток в ростральной преоптической области (Hrabovszky et al. 2010). Анализ с помощью RT-PCR (полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией) показал, что гены KISS1 и KISS1R экспрессируются также в человеческом яичнике, яйцевом и матке, преимущественно в эпителиальных клетках, как на уровне мРНК, так и белка (Cejudo Roman et al. 2012). В яичнике, активность KISS1/KISS1R особенно интенсивна в желтых телах и клетках гранулезы, причём экспрессия KISS1/KISS1R проявляет заметные изменения в зависимости от состояния дифференцировки гранулезных клеток. При этом экспрессия мРНК KISS1R была значительно выше в кумулюсных клетках гранулезы по сравнению с муральными (Cejudo Roman et al. 2012; Gaytán et al. 2009). Антитела к

кисспептину преимущественно располагаются в цитоплазме и в ядре клетки, тогда как KISS1R выявляется в основном на клеточной мембране и в цитоплазме. В целом эти данные свидетельствуют о том, что по крайней мере часть эффектов кессептина при размножении может включать прямое действие на уровне яичников, включающее регуляцию функции клеток гранулезы (García-Ortega et al. 2014)

Демонстрация обязательной роли системы кисспептина и его рецептора в половом созревании человека твердо укоренила этот пептид в качестве важнейшего регулятора репродуктивной функции. В 2003 году две независимые группы ученых открыли инактивирующие точечные мутации и делеции у KISS1R, которые были связаны с развитием пубертата у некоторых пациентов с гипогонадотропном гипогонадизмом (это заболевание характеризуется нарушением гипоталамо-гипофизарной системы) (de Roux et al. 2003; Seminara et al. 2003). Похожее действие данный пептид оказывает и у животных. У GPR54 нокаут-мышей также не наступает пульсирующая выработка ЛГ и ФСГ и не развивается половая зрелость (Funes et al. 2003). При этом было показано, что начало периода полового созревания, продолжилось у мышей после врожденного (но не пубертатного) удаления кисспептиновых нейронов. Эти животные достигали половой зрелости и были фертильными, хотя и имели более мелкие яичники. Эти данные свидетельствуют о некоторой степени избыточности и компенсации системы кисспептина в мозге. Возможно периферийная экспрессия кисспептина и его рецептора вносит свой вклад в спасение функции половых желез (Mayer and Boehm 2011). Кисспептин вероятно обеспечивает связь между питательно-метаболическим статусом и репродукцией путем оценивания энергетических запасов организма и переводит эту информацию в циклическую секрецию ГнРГ. Показано, что экспрессия мРНК кисспептина и секреция гонадотропинов снижается у половозрелых обезьян при условии голодания (Wahab et al. 2011). Есть данные свидетельствующие о том, что нейроны KNDy (выделяют в том числе и кисспептин) опосредуют как отрицательную, так и положительную

связь воздействия половых стероидов. Кисспептин в воронкообразном ядре опосредует отрицательную обратную связь воздействия эстрогена в организме человека. В период после менопаузы кисспептиновые нейроны воронкообразного ядра гипертрофируются и экспрессируют больше мРНК KISS1, чем у женщин в пременопаузе (Rometo et al. 2007).

У человека первой модельной болезнью использованной для изучения терапевтического потенциала кисспептина была гипоталамическая аменорея. Это заболевание характеризуется замедлением циклической секреции ГнРГ, что приводит к преимущественному снижению секреции ЛГ по сравнению с секрецией ФСГ и низкой активности фолликулов яичника. Подкожное введение кисспептина приводит к 10-кратному увеличению ЛГ и 2,5-кратное увеличению секреции ФСГ, соответствующему нормальным физиологическим уровням. Тем не менее, это увеличение гонадотропинов не приводило к значащему повышению секреции эстрадиола, поэтому нормальный фолликулогенез не был восстановлен. В соответствии с этим, повторное подкожное введение кисспептина два раза в день в течение 2-х недель привело к начальной стимуляции ЛГ и ФСГ, которая далее не поддерживалась, то есть наблюдалась тахифилаксия (Jayasena et al. 2009). Тем не менее усиление стимулирующего действия кисспептина и нейрокина В с использованием соответствующих агонистов и подавление ингибиторной секреции динарфина с использованием его антагонистов, могут иметь терапевтический потенциал для заболеваний с пониженной секреции гонадотропина (Jayasena et al. 2010). Было также показано, что секреция гонадотропинов восстанавливается при введении продуктов кисспептина у мужчин больных гипогонадотропным гипогонадизмом, с побочными мутациями в нейрокине В и/или его рецепторе (Young et al. 2013). Однако у крыс кисспептин влияет на эстральный цикл через нормализацию уровней половых гормонов. Введение экзогенного кисспептина способствует восстановлению нормального полового цикла у самок с восстановлением фазы овуляции (Зарубина и Лысова 2015).

В плазме крови у мужчин и небеременных женщин уровень кинспептина практически не детектируется. Наиболее значительное повышение концентрации кинспептина наблюдают только при беременности. Установлено, что источником такого высокого уровня циркулирующего кинспептина является плацента. Специфические мембранные рецепторы кинспептина обнаруживаются, в этот период, на клетках иммунной системы, в том числе и на моноцитах. С учетом того, что кинспептин появляется в циркуляции преимущественно в период беременности, он способен оказывать системное влияние на клетки иммунной системы только в этот период. Предполагается, что кинспептин, который появляется в кровотоке беременных женщин и в силу этого способен специфически регулировать функциональную активность моноцитов, является новым, ранее не учитываемым фактором иммунорегуляции во время физиологически протекающей беременности. (Горбунова и др. 2013). Другое исследование продемонстрировало участие кинспептина в процессах сохранения и вынашивания беременности, и что его уровень может использоваться наряду с уровнем хорионического гонадотропина человека для прогнозирования угрозы выкидыша у беременных (Лысова 2015). Терапия кинспептином имеет потенциал в методах ЭКО. Кинспептин вызывает выброс ЛГ во время индукции овуляции при вспомогательной репродукции с успешным достижением благополучных родов. При этом кинспептин стимулирует более физиологический уровень секреции гонадотропинов, что помогает избежать риска синдрома гиперстимуляции яичников, связанного с используемыми в настоящее время инфекциями хорионического гонадотропина человека (Abbara et al. 2015).

2. 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

2. 1. Материал

Для исследования был взят аутопсийный материал от 3-х пациентов женского пола. Причиной смерти и сопутствующих заболеваний не была установлена патология, связанная с репродуктивной системой. Структура выборки отражена в таблице 1.

Таблица №1. Характеристики выборки.

Пол		Возраст	Диагноз
1	Женский	4 дня	Врожденная диафрагмальная грыжа, порок сердца
2	Женский	1 год 20 дней	Первичный иммунодефицит
3	Женский	1 год 10 месяцев	Дилатационная кардиомиопатия

Забор аутопсийного материала для гистологического исследования был получен на основании закона Российской Федерации от 21.11.2011 года №323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» для уточнения посмертного эпикриза. Забор аутопсийного материала проводился не позднее 12 часов после вскрытия, затем биоматериал транспортировался в физиологическом растворе при оптимальной температуре, после чего был помещен в жидкий азот. Биоматериал получен на базе Санкт-Петербургского Государственного Педиатрического Медицинского Университета. Все исследования проведены в отделе патоморфологии на базе ФГБНУ «Научно-

Исследовательский Институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта».

2. 2. Иммунофлуоресцентный анализ

Для поведения исследования использовались криосрезы и парафиновые срезы толщиной 5 мкм, которые помещались на стекла с полилизинным покрытием. Был использован непрямой метод анализа с антителами от разных животных. В случае криосрезов предварительную фиксацию клеток осуществляли промыванием полученных срезов в течение 5 минут при комнатной температуре (RT) раствором натрий-фосфатного буфера (PBS). Далее, клетки в течение 15 минут (RT) фиксировались с использованием 4% параформальдегида (Sigma, США), после чего вновь промывались в трех сменах PBS по 5 минут. В случае парафиновых срезов стекла сначала помещались в термостат на 10 минут, при $t=60^{\circ}\text{C}$ для лучшей депарафинизации, затем в ксилол на 15 минут, после этого в спирты нисходящей концентрации от 96% до 70% на 5 – 10 минут в каждом. Далее срезы срезы нагревали на водяной бане при температуре 94°C в цитратном буфере (pH 6.0) в течение 20 минут демаскировки антигена. Вместо этого криосрезы пермеабелизовывали 0,1% Triton X-100 (Биолот, РФ) на протяжении 15 минут (RT). Далее оба вида срезов промывали в трех сменах PBS по 5 минут. После срезы с целью блокировки неспецифического связывания инкубировали в Protein Block (Abcam, Великобритания) на протяжении 30 минут. Далее в течение 60 минут производили инкубацию с первичными антителами (RT). Структура первичных антител отражена в таблице 2. Клетки промывали в трех сменах PBS по 5 минут. Затем в отсутствии света срезы 30 минут инкубировали со вторичными антителами. В качестве вторичных использовали козьи антитела Alexa Fluor 647 (1:1000, Abcam) и Alexa Fluor 488 (1:1000, Abcam), конъюгированными с флуорохромом (RT). Клетки трижды по 5 минут промывали в растворе PBS. Ядра докрашивали Hoechst 33258 (Sigma, США; 1:100 от стокового раствора в

dH₂O) в течение 1 минуты. Срезы дважды промывали в PBS на протяжении 5 минут. Готовые препараты заключали под покровные стекла в монтирующую среду Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako, США).

Таблица №2. Первичные антитела, используемые в иммунофлуоресцентном анализе.

Антиген	Антитела	Разведение	Производитель
Кисспептин	Мышиные моноклональные	1:140	Abcam
Рецептор кисспептина	Кроличьи моноклональные	1:70	Abcam
Рецептор антимюллерова гормона	Мышиные моноклональные	1:70	Abcam
Ароматаза	Кроличьи моноклональные	1:30	Abcam

2. 3. Морфометрия

Для визуализации полученных реакций на антитела препараты фотографировали при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus CX-21 и цифровой камеры Olympus Camedia 4040z. Использовались лазеры с соответствующими длинами волн. Для оценки результатов иммунофлуоресцентного окрашивания проводили морфометрическое исследование микрофотографий с использованием программного обеспечения ВидеоТест Морфология 5.2. (Россия). Для проведения анализа с каждого препарата сфотографировано и проанализировано по 5 полей зрения при увеличении 400х. Оценка результатов проводилась по показателям относительной площади экспрессии (ОПЭ). Относительную площадь экспрессии рассчитывали как отношение

площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади поля зрения и выражали в процентах. Этот параметр характеризует площадь распространения экспрессии

2.4. Статистический анализ результатов исследования

Статистический анализ полученных данных проводили с применением методов описательной и непараметрической статистики в соответствии с параметрами выборок. Для математико-статистической обработки использовали пакеты программ прикладного статистического анализа “Statistica 10.0” и программного обеспечения MS Excel 2013. Были вычислены средние арифметические, стандартные ошибки. Для оценки межгрупповых различий значений признаков при сравнении выборок для оценки влияния возраста использовался Критерий Краскела – Уоллиса (многомерное обобщение критерия Манна – Уитни). Анализ зависимости между признаками проводили с помощью коэффициента корреляции Спирмена. Для всех критериев и тестов величину критического уровня значимости принимали равной 0,05, т.е. различия признавали статистически значимыми при $p < 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3. 1. Экспрессия кисспептина, рецептора кисспептина, рецептора антимюллера гормона и ароматазы в яичниках детей разного возраста.

Экспрессия кисспептина, рецептора кисспептина, рецептора антимюллера гормона и ароматазы наблюдалась в тканях яичника во всех исследованных возрастных группах. Полученные значения отражены в таблице №3 и на рисунке №1

Таблица №3. Относительная площадь экспрессии \pm стандартное отклонение, %

Возраст	Кисспептин	Рецептор кисспептина	Рецептор антимюллера гормона	Ароматаза
4 дня	$22,10 \pm 5,31$	$24,24 \pm 3,91$	$24,19 \pm 6,16$	$37,58 \pm 3,76$
1 год 20 дней	$3,69 \pm 0,74$	$13,08 \pm 6,22$	$39,19 \pm 5,11$	$32,62 \pm 4,02$
1 год 10 месяцев	$15,46 \pm 2,86$	$19,22 \pm 5,78$	$20,18 \pm 7,34$	$27,20 \pm 3,63$

Достоверность различий в возрастных группах не была выявлена. Корреляция между экспрессией и возрастом была выявлена только в случае ароматазы. Таким образом, это говорит о том, что возраст не влияет на экспрессию кисспептина, рецептора кисспептина, рецептора антимюллера гормона. Корреляции между относительной площадью экспрессии ароматазы и возрастом представлены на рисунке №2. Коэффициент корреляции Спирмена составил: -0,85. Данное значение говорит о наличие сильной обратной связи между исследуемый величинами. Результаты иммунофлуоресцентного анализа представлена на рисунках №3 – 6.

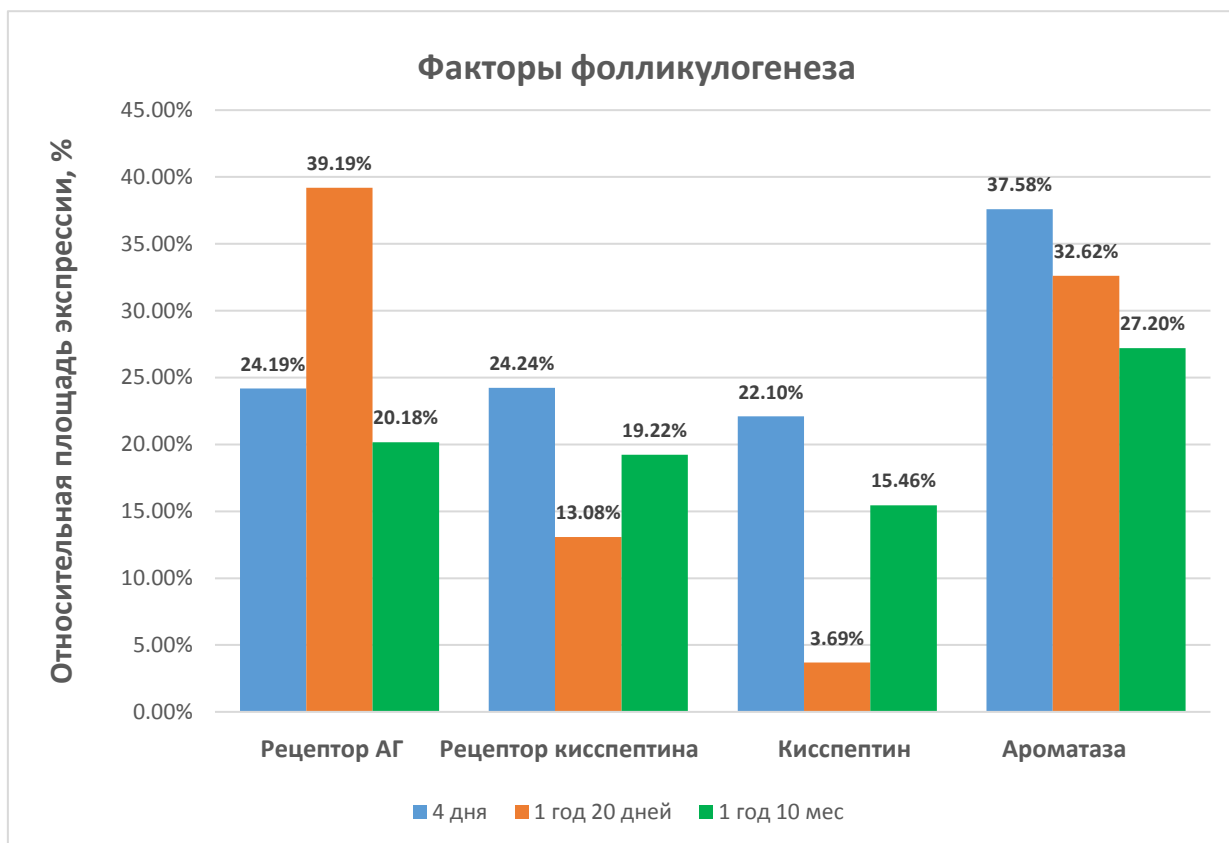


Рис. №1. Значения относительной площади экспрессии факторов фолликулогенеза в яичниках детей разного возраста.

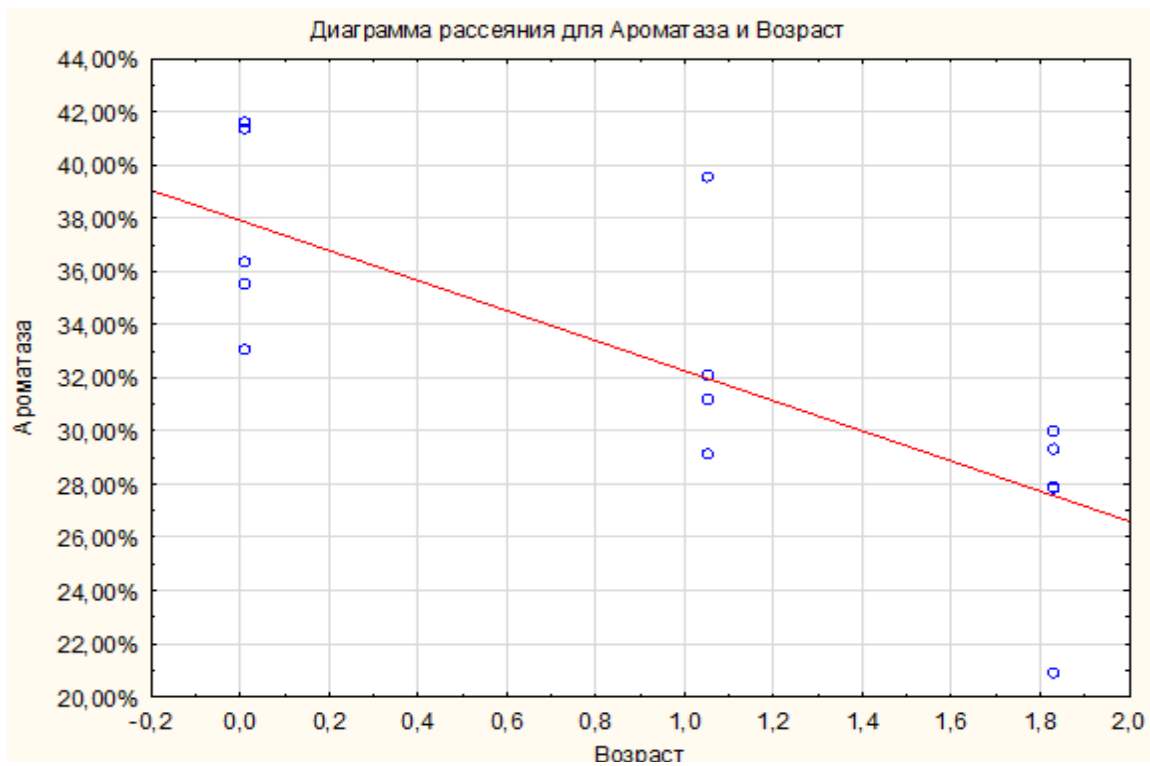


Рис. №2. Зависимость экспрессии ароматазы в яичниках от возраста детей. Красная линия – линия тренда; синие круги – экспериментальные данные. По оси абсцисс – возраст (в годах), по оси ординат – относительная площадь экспрессии (в %).

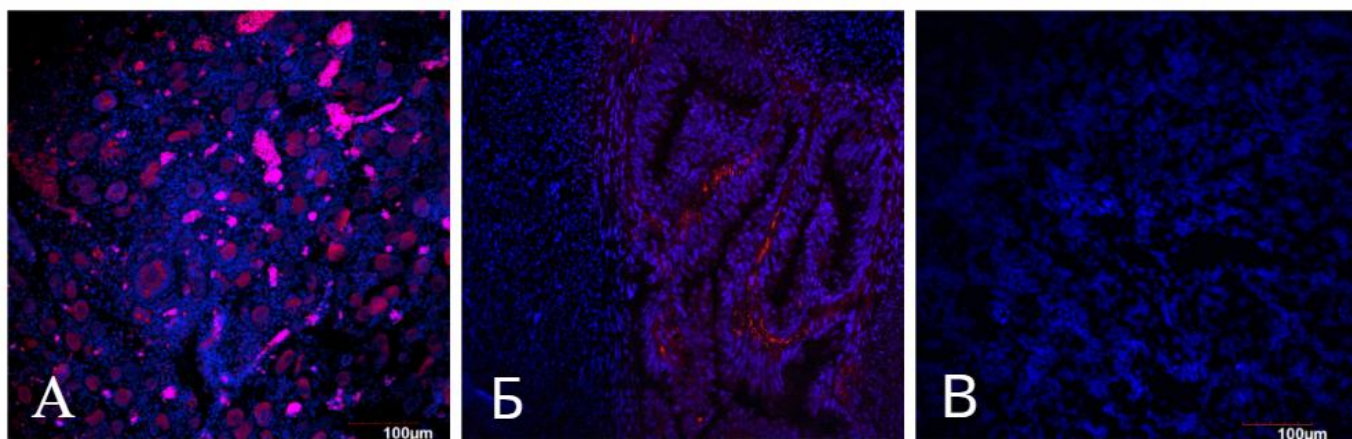


Рис. №3. Иммунофлуоресцентный анализ. Экспрессия киспептина – красная флюоресценция, ядра клеток – синяя флюоресценция. А – экспрессия киспептина в яичнике; Б – положительный контроль окрашивания, экспрессия киспептина в эндометрии; В – отрицательный контроль окрашивания, яичник. Увеличение = 200х. Масштаб = 100 мкм.

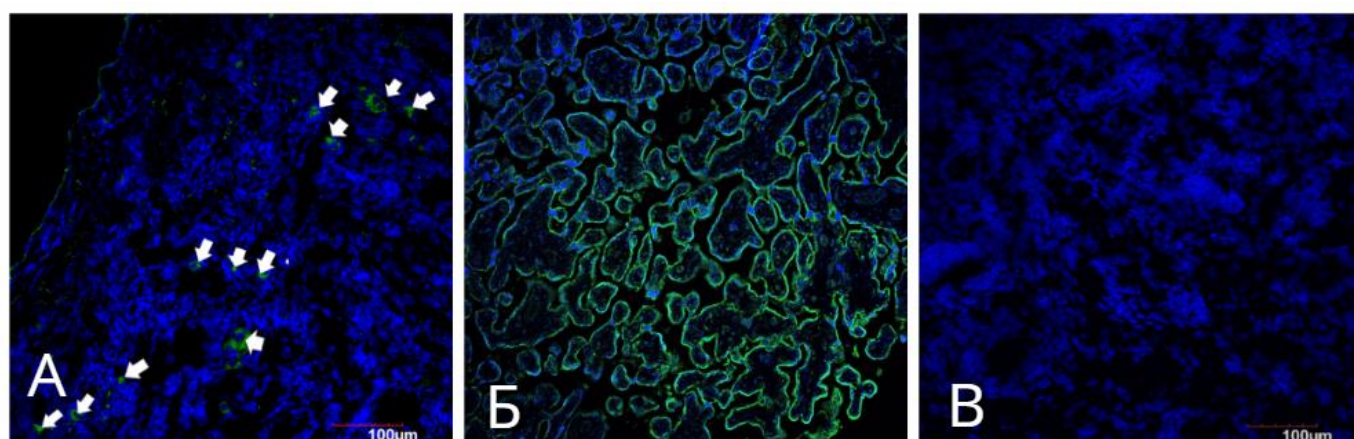


Рис. №4. Иммунофлуоресцентный анализ. Экспрессия рецептора киспептина в яичнике – зеленая флюоресценция (белые стрелки), ядра клеток – синяя флюоресценция. А – экспрессия рецептора киспептина в яичнике; Б – положительный контроль окрашивания, экспрессия рецептора киспептина в плаценте; В – отрицательный контроль окрашивания, яичник. Увеличение = А и В – 200х, Б – 100х. Масштаб = 100 мкм.

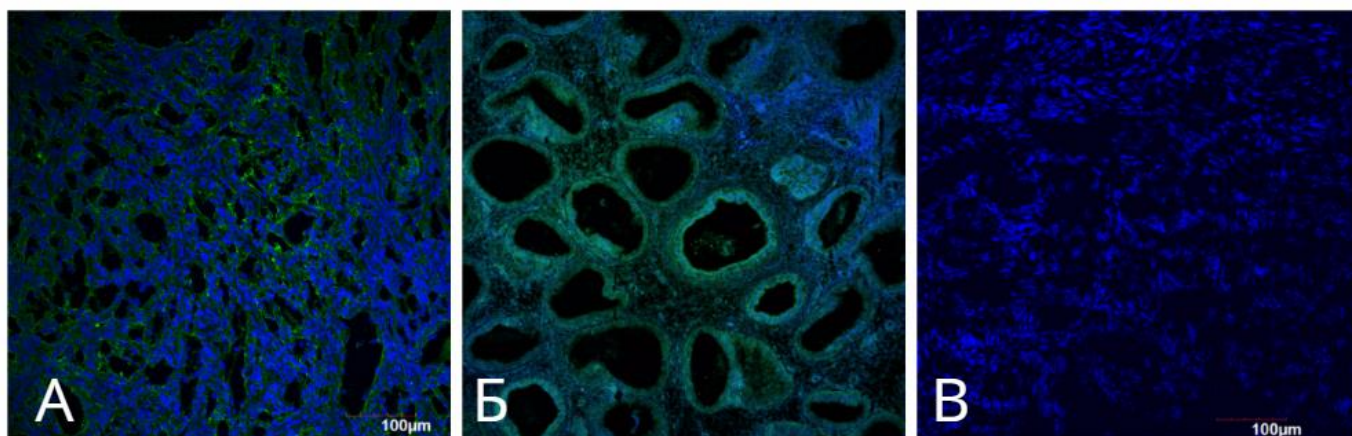


Рис. №5. Иммунофлуоресцентный анализ. Экспрессия ароматазы в яичнике – зеленая флюоресценция, ядра клеток – синяя флюоресценция. А – экспрессия ароматазы в яичнике; Б – положительный контроль окрашивания, экспрессия ароматазы в эндометрии; В – отрицательный контроль окрашивания, яичник. Увеличение = А и В – 200х, Б – 100х. Масштаб = 100 мкм.

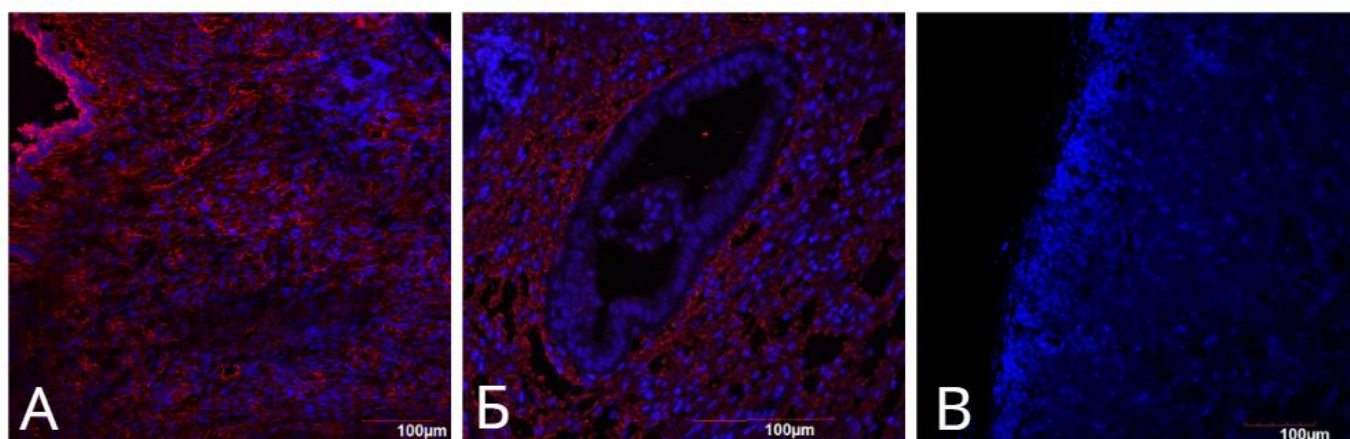


Рис. №6. Иммунофлуоресцентный анализ. Экспрессия рецептора антимюллера гормона – красная флюоресценция, ядра клеток – синяя флюоресценция. А – экспрессия рецептора антимюллера гормона в яичнике; Б – положительный контроль окрашивания, экспрессия рецептора антимюллера гормона в эндометрии; В – отрицательный контроль окрашивания, яичник. Увеличение = А и В – 200х, Б – 400х. Масштаб = 100 мкм.

3. 2. Корреляции между экспрессией различных факторов фолликулогенеза в яичниках детей.

По полученным данным был выполнен корреляционный анализ с использованием коэффициента корреляции Спирмена. В результате корреляционного анализа была выявлена взаимосвязь между экспрессией кисспептина и рецептора АМГ. Коэффициент корреляции Спирмена между экспрессией этих молекул составил: -0,60, что говорит о наличии средней обратной связи данных величин. Полученные закономерности отражены на рисунках №7 и №8. В случае остальных молекул выявить статистически значимую корреляцию не удалось.

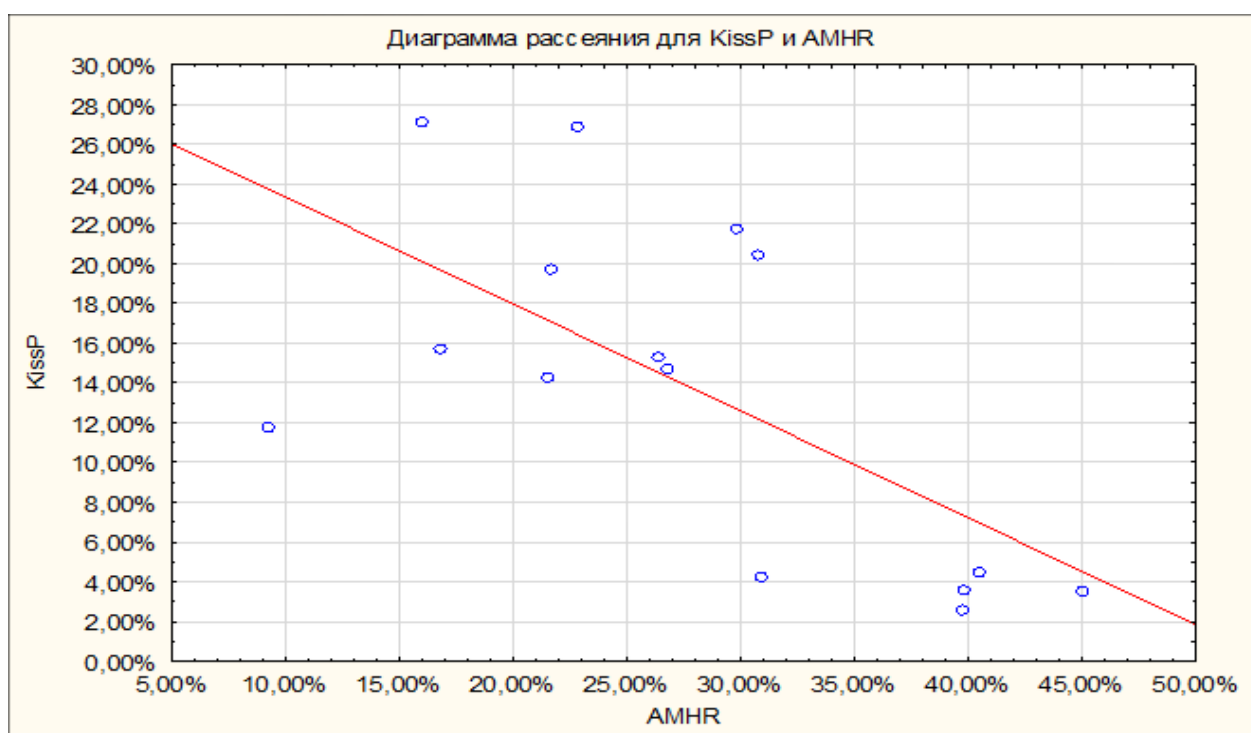


Рис. №7. Зависимость экспрессии рецепторы АМГ от экспрессии кисспептина в яичниках детей. Красная линия – линия тренда; синие круги – экспериментальные данные. По оси абсцисс относительная площадь экспрессии (в %) рецептора АМГ, по оси ординат – кисспептина.

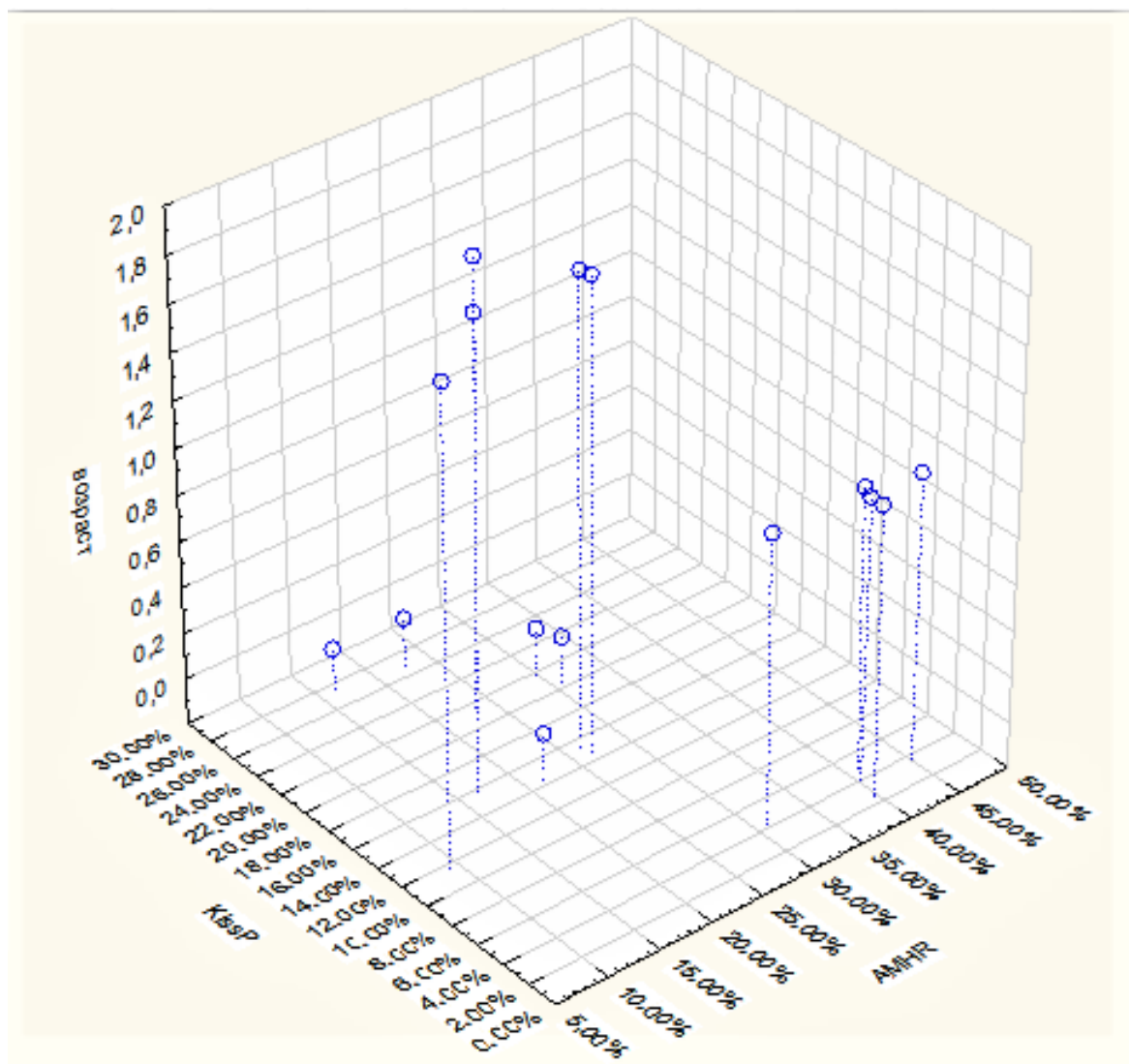


Рис. №8. Трехмерная диаграмма рассеивания. Зависимость экспрессии рецепторы АМГ от экспрессии киссептина в яичниках детей разного возраста. Синие пунктирные линии – возраст (в годах), соответствуют оси ампликат; синие круги – экспериментальные данные. По оси абсцисс относительная площадь экспрессии (в %) рецептора АМГ, по оси ординат – киссептина.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные по относительной площади экспрессии ароматазы говорят об уменьшении её синтеза с увеличением возраста. Это согласуется с данными о том, что высокий уровень материнских эстрогенов во время беременности тормозит синтез гонадотропинов гипофизом ребенка. Резкое снижение концентрации материнских эстрогенов в крови девочек после рождения по принципу возвратного эффекта приводит к выбросу ФСГ и ЛГ гипофизом, что обуславливает усиление эстрогенсинтезирующей функции яичников (Радзинский и Фукс 2014). Показано, что эстрадиол усиливает экспрессию ароматазы, которая индуцируется ФСГ, в гранулезных клетках, и оба гормона необходимы для создания полностью дифференцированного и здорового преовуляторного фолликула. При этом сам эстрадиол действует аутокринным образом для усиления действия ФСГ. Предполагается, что этот эффект эстрадиола, направленный на созревание фолликула, играет ключевую роль в доминантности фолликулов (Adashi and Hsueh 1982; Fitzpatrick and Richards 1991). Экспрессия ароматазы постепенно увеличивается как в преантральных, так и в малых антральных фолликулах в яичниках новорождённых крысят. У 21-дневных крыс ароматаза больше не экспрессируется растущими фолликулами, а ограничена здоровыми крупными антральными фолликулами. Это свидетельствует о том, что появление активности ароматазы и её мРНК у новорожденных крыс тесно коррелирует с развитием первичных и вторичных фолликулов. У более старых животных экспрессия ароматазы также ограничивается здоровыми крупными антральными и преовуляторными фолликулами (Guigon et al. 2003). Это также подтверждает полученные данные и говорит о возможности протекания сходных процессов у человека.

Полученные нами сведения об отсутствии зависимости между синтезом AMHR-II и возрастом подтверждают данные, полученные на животных. Показано, что у самок крыс экспрессия AMHR-II относительно постоянно

поддерживается на определенном уровне вдоль длины мюллерова протока и далее его производных, обнаруживаясь даже при беременности (Salhi et al. 2004).

Полученные данные о средних значения ОПЭ кисспептина и его рецептора согласуются с предыдущими исследованиями. Исследования взрослых женщин показали что, экспрессия мРНК KISS1R значительно выше в кумулюсных клетках гранулезы по сравнению с муральными. В то время как для кисспептина эти показатели одинаковы. (Cejudo Roman et al. 2012; Gaytán et al. 2009) Весьма интересна обнаруженная обратная корреляция между рецепторами АМГ и кисспептина. Это свидетельствует о конкуренции процессов покоя и отбора фолликулов. При анализе литературы не найдены данные по зависимости синтеза кисспептина и его рецептора от возраста, а также по связи кисспептина и его рецептора между собой и связи АМГР и ароматазы. В данном исследовании корреляции между указанными молекулами не были обнаружены.

ВЫВОДЫ

- 1) Иммунофлуоресцентный анализ выявляет факторы фолликулогенеза, а именно: кисспептин, рецептор кисспептина, ароматазу, рецептор антимюллера гормона.
- 2) Установлена площадь распространения экспрессии кисспептина, рецептора кисспептина, ароматазы и рецептора антимюллера гормона в яичниках.
- 3) Ароматаза отрицательно коррелирует с возрастом
- 4) Кисспептин отрицательно коррелирует с синтезом рецептора антимюллера гормона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abbara A., Jayasena C. N., Christopoulos G., Narayanaswamy S. 2015. "Efficacy of Kisspeptin-54 to Trigger Oocyte Maturation in Women at High Risk of Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS) during in Vitro Fertilization (IVF) Therapy." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100(9): 3322–31.
2. Adashi E.Y. and A.W. Hsueh. 1982. "Estrogens Augment the Stimulation of Ovarian Aromatase Activity by Follicle-Stimulating Hormone in Cultured Rat Granulosa Cells." *Journal of Biological Chemistry* 257(11): 6077–83.
3. Allard S., Adin P., Gouédard L. 2000. "Molecular Mechanisms of Hormone-Mediated Müllerian Duct Regression: Involvement of Beta-Catenin." *Development (Cambridge, England)* 127(15): 3349–60.
4. Amaranth B., Corbin Jo, Peterson A. 1993. "Functional Domains of Human Aromatase Cytochrome P450 Characterized by Linear Alignment and Site-Directed Mutagenesis." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 7(12): 1617–24.
5. Anttonen M. and Farkilla A. 2011. "Anti-Müllerian Hormone Inhibits Growth of AMH Type II Receptor-Positive Human Ovarian Granulosa Cell Tumor Cells by Activating Apoptosis." *Laboratory Investigation* 91(11): 1605–14.
6. Britt K. L., Drummond A. E., Cox V. A. 2000. "An Age-Related Ovarian Phenotype in Mice with Targeted Disruption of the Cyp 19 (Aromatase) Gene." *Endocrinology* 141(7): 2614–23.
7. Cate R. L., Mattaliano R. J., Hesston S. 1986. "Isolation of the Bovine and Human Genes for Müllerian Inhibiting Substance and Expression of the Human Gene in Animal Cells." *Cell* 45(5): 685–98.
8. Cejudo Roman A., Pinto F. M., Dorta I. P. 2012. "Analysis of the Expression of Neurokinin B, Kisspeptin, and Their Cognate Receptors NK3R and KISS1R in the Human Female Genital Tract." *Fertility and Sterility* 97(5): 1213–19.

9. Chen S. M., J. Berman, Sparklers R. S. 1988. "Human Aromatase: cDNA Cloning, Southern Blot Analysis, and Assignment of the Gene to Chromosome 15." *DNA* 7(1): 27–38
10. Clarke T. R., Hoshiya Y., Soyun E. "Mullerian Inhibiting Substance Signaling Uses a Bone Morphogenetic Protein (BMP)-Like Pathway Mediated by ALK2 and Induces Smad6 Expression." *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 15(6): 946–59.
11. Di Clemente N., N. Jossen, L. Gouédard and C. Belville. 2003. "Components of the Anti-Müllerian Hormone Signaling Pathway in Gonads." *Molecular and Cellular Endocrinology* 211(1-2): 9–14.
12. Conte F. A., Crumbach M. M., Ito Y. 1994. "A Syndrome of Female Pseudohermaphroditism, Hypergonadotropic Hypogonadism, and Multicystic Ovaries Associated with Missense Mutations in the Gene Encoding Aromatase (P450arom)." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 78(6): 1287–92.
13. Couse J. F., Hewitt S. C., Bunch D. O. "Postnatal Sex Reversal of the Ovaries in Mice Lacking Estrogen Receptors Alpha and Beta." *Science* 286(5448): 2328–31.
14. Couse, John F., Mariana M. Yates, Bonnie J. Deroo and Kenneth S. Korach. 2005. "Estrogen Receptor- β Is Critical to Granulosa Cell Differentiation and the Ovulatory Response to Gonadotropins." *Endocrinology* 146(8): 3247–62.
15. Durlinger L. L., Grujters J. G., Kramer P. 2001. "Anti-Mullerian Hormone Attenuates the Effects of FSH on Follicle Development in the Mouse Ovary." *Endocrinology* 142(11): 4891–99.
16. Elvin J. A., Yan C., Wang P. 1999. "Molecular Characterization of the Follicle Defects in the Growth Differentiation Factor 9-Deficient Ovary." *Molecular Endocrinology* 13(6): 1018–34.
17. Erickson G F, V G Garza and D A Magoffin. 1989. "Insulin-like Growth

- Factor-I Regulates Aromatase Activity in Human Granulosa and Granulosa Luteal Cells.” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 69(4): 716–24.
18. Fisher Carolyn R, Kathy H Graves, Albert F Parlor and Evan R Simpson. 1998. “Characterization of Mice Deficient in Aromatase (ArKO) because of Targeted Disruption of the cyp19 Gene.” *Medical Sciences* 95(June): 6965–70.
19. Fitzpatrick S L and J S Richards. 1991. “Regulation of P-450 Aromatase Messenger Ribonucleic Acid and Activity by Steroids and Gonadotropin in Rat Granulosa Cells.” *Endocrinology* 129(3)(3): 1452–62.
20. Forabosco A., Sforza C., Pol A. 1991. “Morphometric Study of the Human Neonatal Ovary.” *The Anatomical record* 231: 201–8.
21. Forabosco Antonio and Chiarella Sforza. 2007. “Establishment of Ovarian Reserve: A Quantitative Morphometric Study of the Developing Human Ovary.” *Fertility and Sterility* 88(3): 675–83.
22. Funes S., Hedrick J. A., Vassileva G. 2003. “The KiSS-1 Receptor GPR54 Is Essential for the Development of the Murine Reproductive System.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312(4): 1357–63.
23. García-Ortega J., Pinto F. M., Prados N. 2014. “Expression of Neurokinin B/NK3 Receptor and kisspeptin/KISS1 Receptor in Human Granulosa Cells.” *Human Reproduction* 29(12): 2736–46.
24. Gaytán F., Gaytán M., Castellano J. M. “KiSS-1 in the Mammalian Ovary: Distribution of Kisspeptin in Human and Marmoset and Alterations in KiSS-1 mRNA Levels in a Rat Model of Ovulatory Dysfunction.” *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 296(3): E520–31.
25. Gerber S., Megale R., Vale F. 2012. “Variation in Ovarian Follicle Density during Human Fetal Development.” *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 29(9): 969–72.

26. George, Fredrick W., and Jean D. Wilson. 1978. "Conversion of Androgen to Estrogen by the Human Fetal Ovary." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 47(3): 550–55.
27. Ghosh, Debashis, Jennifer Griswold, Mary Erman, and Walter Pangborn. 2009. "Structural Basis for Androgen Specificity and Oestrogen Synthesis in Human Aromatase." *Nature* 457(7226): 219–23.
28. Gouédard, L et al. 2000. "Engagement of Bone Morphogenetic Protein Type IB Receptor and Smad1 Signaling by Anti-Müllerian Hormone and Its Type II Receptor." *The Journal of biological chemistry* 275(36): 27973–78.
29. Guigon, Céline J. et al. 2003. "Unaltered Development of the Initial Follicular Waves and Normal Pubertal Onset in Female Rats after Neonatal Deletion of the Follicular Reserve." *Endocrinology* 144(8): 3651–62.
30. Hrabovszky, E. et al. 2010. "The Kisspeptin System of the Human Hypothalamus: Sexual Dimorphism and Relationship with Gonadotropin-Releasing Hormone and Neurokinin B Neurons." *European Journal of Neuroscience* 31(11): 1984–98.
31. Imbeaud, S et al. 1995. "Insensitivity to Anti-Müllerian Hormone due to a Mutation in the Human Anti-Müllerian Hormone Receptor." *Nature genetics* 11(4): 382–88.
32. Jamin, Soazik P et al. 2002. "Requirement of Bmpr1a for Müllerian Duct Regression during Male Sexual Development." *Nature genetics* 32(October): 408–10.
33. Jamin, Soazik P. et al. 2003. "Genetic Studies of the AMH/MIS Signaling Pathway for Mullerian Duct Regression." *Molecular and Cellular Endocrinology* 211(1-2): 15–19.
34. Jayasena, C N et al. 2010. "Twice-Weekly Administration of Kisspeptin-54 for 8 Weeks Stimulates Release of Reproductive Hormones in Women with

- Hypothalamic Amenorrhea.” *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 88(6): 840–47.
35. Jayasena, Channa N. et al. 2009. “Subcutaneous Injection of Kisspeptin-54 Acutely Stimulates Gonadotropin Secretion in Women with Hypothalamic Amenorrhea, but Chronic Administration Causes Tachyphylaxis.” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94(11): 4315–23.
36. Kevenaar, M.E. et al. 2007. “Anti-Müllerian Hormone and Anti-Müllerian Hormone Type II Receptor Polymorphisms Are Associated with Follicular Phase Estradiol Levels in Normo-Ovulatory Women.” *Human Reproduction* 22(6): 1547–54.
37. Korach, Kenneth S. et al. 2003. “Update on Animal Models Developed for Analyses of Estrogen Receptor Biological Activity.” *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 86(3-5): 387–91.
38. Kotani, Masato et al. 2001. “The Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 Encodes Kisspeptins, the Natural Ligands of the Orphan G Protein-Coupled Receptor GPR54.” *Journal of Biological Chemistry* 276(37): 34631–36.
39. Lee, Dennis K. et al. 1999. “Discovery of a Receptor Related to the Galanin Receptors.” *FEBS Letters* 446(1): 103–7.
40. Lee, J H et al. 1996. “KiSS-1, a Novel Human Malignant Melanoma Metastasis-Suppressor Gene.” *Journal of the National Cancer Institute* 88(23): 1731–37.
41. Lin, H Y, and H F Lodish. 1993. “Receptors for the TFG-Beta Superfamily: Multiple Polypeptides and Serine/threonine Kinases.” *Trends Cell Biol* 3(January): 14–19.
42. Masiakos, P T et al. 1999. “Human Ovarian Cancer, Cell Lines, and Primary Ascites Cells Express the Human Müllerian Inhibiting Substance (MIS) Type II Receptor, Bind, and Are Responsive to MIS.” *Clin Cancer Res*

5(11): 3488–99.

43. Mason, H D, S Cwyfan-Hughes, J M Holly, and S Franks. 1998. “Potent Inhibition of Human Ovarian Steroidogenesis by Insulin-like Growth Factor Binding Protein-4 (IGFBP-4).” *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83(1): 284–87.

44. Mayer, Christian, and Ulrich Boehm. 2011. “Female Reproductive Maturation in the Absence of kisspeptin/GPR54 Signaling.” *Nature neuroscience* 14(6): 704–10.

45. Mendelson, Carole R., and Amrita Kamat. 2007. “Mechanisms in the Regulation of Aromatase in Developing Ovary and Placenta.” *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 106(1-5): 62–70.

46. Michelle L. Gottsch, Donald K Clifton, and Robert A. Steiner. 2010. “NIH Public Access.” *Peptides* 30(1): 4–9.

47. Min, Le et al. 2014. “Dynamic Kisspeptin Receptor Trafficking Modulates Kisspeptin-Mediated Calcium Signaling.” *Molecular Endocrinology* 28(1): 16–27.

48. Mishina, Yuji et al. 1996. “Genetic Analysis of the Müllerian-Inhibiting Substance Signal Transduction Pathway in Mammalian Sexual Differentiation.” *Genes & development* 10(20): 2577–87.

49. Muir, Alison I. et al. 2001. “AXOR12, a Novel Human G Protein-Coupled Receptor, Activated by the Peptide KiSS-1.” *Journal of Biological Chemistry* 276(31): 28969–75.

50. Naftolin, Frederick et al. 2007. “Estrogen-Induced Hypothalamic Synaptic Plasticity and Pituitary Sensitization in the Control of the Estrogen-Induced Gonadotrophin Surge.” *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 14(2): 101–16.

51. Nakao, Atsuhito et al. 1997. “TGF- β Receptor-Mediated Signalling through Smad2, Smad3 and Smad4.” *EMBO Journal* 16(17): 5353–62.

52. NELSON, DAVID R. et al. 1993. "The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers, Early Trivial Names of Enzymes, and Nomenclature." *DNA and Cell Biology* 12(1): 1–51.
53. Ohtaki, T. et al. 2001. "Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 Encodes Peptide Ligand of a G-Protein-Coupled Receptor." *Nature* 411(6837): 613–17.
54. Otsuka, Fumio, Shin Yamamoto, Gregory F. Erickson, and Shunichi Shimasaki. 2001. "Bone Morphogenetic Protein-15 Inhibits Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Action by Suppressing FSH Receptor Expression." *Journal of Biological Chemistry* 276(14): 11387–92.
55. Rajpert-De Meyts, E et al. 1999. "Expression of Anti-Müllerian Hormone during Normal and Pathological Gonadal Development: Association with Differentiation of Sertoli and Granulosa Cells." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84(10): 3836–44.
56. Rometo, Adonna M., Sally J. Krajewski, Mary Lou Voytko, and Naomi E. Rance. 2007. "Hypertrophy and Increased Kisspeptin Gene Expression in the Hypothalamic Infundibular Nucleus of Postmenopausal Women and Ovariectomized Monkeys." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92(7): 2744–50.
57. de Roux, Nicolas et al. 2003. "Hypogonadotropic Hypogonadism due to Loss of Function of the KiSS1-Derived Peptide Receptor GPR54." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 10972–76.
58. Salhi, Imed et al. 2004. "The Anti-Müllerian Hormone Type II Receptor: Insights into the Binding Domains Recognized by a Monoclonal Antibody and the Natural Ligand." *The Biochemical journal* 379: 785–93.
59. Satoh, M. 1991. "Histogenesis and Organogenesis of the Gonad in Human Embryos." *Journal of anatomy* 177: 85–107.
60. Schomberg, D W et al. 1999. "Targeted Disruption of the Estrogen Receptor-Alpha Gene in Female Mice: Characterization of Ovarian Responses and

- Phenotype in the Adult.” *Endocrinology* 140(6): 2733–44.
61. Segev, Dorry L et al. 2002. “Mullerian-Inhibiting Substance Regulates NF-Kappa B Signaling in the Prostate in Vitro and in Vivo.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(1): 239–44.
 62. Seminara, Stephanie B et al. 2003. “The GPR54 Gene as a Regulator of
 63. Puberty.” *New England Journal of Medicine* 349(17): 1614–27.
 64. Sforza, Chiarella, Andrea Ranzi, Virgilio F. Ferrario, and Antonino Forabosco. 2004. “Growth Patterns of Human Ovarian Volume during Intrauterine and Postnatal Organogenesis.” *Early Human Development* 80(1): 7–17.
 65. Sforza, Chiarella, Laura Vizzotto, Virgilio F. Ferrario, and Antonino Forabosco. 2003. “Position of Follicles in Normal Human Ovary during Definitive Histogenesis.” *Early Human Development* 74(1): 27–35.
 66. Simmons, Daniel L, Peter A Lalleytii, and Charles B Kasper. 1984. “Chromosomal Assignments of Genes Coding for Components of the Mixed-Function Oxidase System in Mice.” *The Journal of biological chemistry* 260(1): 515–21.
 67. Simpson, Evan R. 2004. “Models of Aromatase Insufficiency.” *Seminars in Reproductive Medicine* 22(1): 25–30.
 68. Skinner, Michael K. 2005. “Regulation of Primordial Follicle Assembly and Development.” *Human Reproduction Update* 11(5): 461–71.
 69. Spicer, Leo J. et al. 2006. “Growth Differentiation Factor-9 Has Divergent Effects on Proliferation and Steroidogenesis of Bovine Granulosa Cells.” *Journal of Endocrinology* 189(2): 329–39.
 70. Steinkampf, M P, C R Mendelson, and E R Simpson. 1988. “Effects of Epidermal Growth Factor and Insulin-like Growth Factor I on the Levels of mRNA Encoding Aromatase Cytochrome P-450 of Human Ovarian Granulosa Cells.” *Molecular and cellular endocrinology* 59(1-2): 93–99.

71. Terada, N et al. 1984. "Augmentation of Aromatase-Activity by Fsh in Ovaries of Fetal and Neonatal Mice in Organ-Culture." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 20(3): 741–45.
72. Thompson Jr., E A, and P K Siiteri. 1974. "The Involvement of Human Placental Microsomal Cytochrome P-450 in Aromatization." *Journal of Biological Chemistry* 249(176): 5373–78.
73. Turner, K J et al. 2002. "Development and Validation of a New Monoclonal Antibody to Mammalian Aromatase." *The Journal of endocrinology* 172(1): 21–30.
74. Visser, Jenny A et al. 2001. "The Serine/threonine Transmembrane Receptor ALK2 Mediates Müllerian Inhibiting Substance Signaling." *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 15(6): 936–45.
75. Visser, Jenny A., and A. P N Themmen. 2005. "Anti-Mullerian Hormone and Folliculogenesis." *Molecular and Cellular Endocrinology* 234(1-2): 81–86.
76. Vitt, U A, M Hayashi, C Klein, and A J Hsueh. 2000. "Growth Differentiation Factor-9 Stimulates Proliferation but Suppresses the Follicle-Stimulating Hormone-Induced Differentiation of Cultured Granulosa Cells from Small Antral and Preovulatory Rat Follicles." *Biology of reproduction* 62(2): 370–77.
77. Wahab, F. et al. 2011. "Decrease in Hypothalamic kiss1 and kiss1r Expression: A Potential Mechanism for Fasting-Induced Suppression of the HPG Axis in the Adult Male Rhesus Monkey (Macaca Mulatta)." *Hormone and Metabolic Research* 43(2): 81–85.
78. West, A, P J Vojta, D R Welch, and B E Weissman. 1998. "Chromosome Localization and Genomic Structure of the KiSS-1 Metastasis Suppressor Gene (KISS1)." *Genomics* 54(1): 145–48.
79. Wu, Yan-guang, Jill Bennett, Deepika Talla, and Carlos Stocco. 2011. "Testosterone, Not 5 α -Dihydrotestosterone, Stimulates LRH-1 Leading to FSH-Independent Expression of Cyp19 and P450scc in Granulosa Cells." *Molecular*

- endocrinology (Baltimore, Md.)* 25(4): 656–68.
80. Yoshida, Yoko et al. 2014. “Analyzing the Possible Involvement of Anti-Mullerian Hormone and Anti-Mullerian Hormone Receptor II Single Nucleotide Polymorphism in Infertility.” *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 31(2): 163–68.
81. Young, Jacques et al. 2013. “Kisspeptin Restores Pulsatile LH Secretion in Patients with Neurokinin B Signaling Deficiencies: Physiological, Pathophysiological and Therapeutic Implications.” *Neuroendocrinology* 97(2): 193–202.
82. Zhou, Jian, T Rajendra Kumar, Martin M Matzuk, and C Bondy. 1997. “Insulin-like Growth Factor I Regulates Gonadotropin Responsiveness in the Murine Ovary.” *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 11(13): 1924–33.
83. Лысова. А. Н. 2015. Уровень кисспептина у женщин с прерывание беременности в ранние сроки.” *Вестник медицинского института «РЕАВИЗ»* 4: 65–67.
84. Боровая, Т. Г. 2011. “Половая система.” *Руководство по гистологии, глава 16*, Санкт-Петербург: СпецЛит, 398–425.
85. Зарубина Е.Г. и Лысова А. Н. 2015. “Роль кисспептина в нормализации взрослых самок крыс.” *Вестник медицинского института «РЕАВИЗ»* 5: 65–67.
86. О. Л. Горбунова и Ширшев С. В. 2013. “Влияние кисспептина на функциональную активность моноцитов.” *Клеточная иммунология* 5: 2–6.
87. Радзинский В. Е. 2014. *Гинекология. Учебник*:988.